(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) **公開特許公報（Ａ）**　(11)特許出願公開番号
特開2001－258590
（P2001－258590A）
(43)公開日　平成13年９月25日(2001.9.25)

(51)Int.Cl.'	識別記号	ＦＩ		テーマコード'(参考)
Ｃ１２Ｑ　1/06		Ｃ１２Ｑ　1/06		２Ｇ０４５
1/04		1/04		４Ｂ０６３
Ｇ０１Ｎ　33/48		Ｇ０１Ｎ　33/48		Ｐ
//（Ｃ１２Ｑ　1/06		（Ｃ１２Ｑ　1/06		
Ｃ１２Ｒ　1:01）		Ｃ１２Ｒ　1:01）		

審査請求　未請求　請求項の数10　ＯＬ　（全 11 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000－80998(P2000－80998)

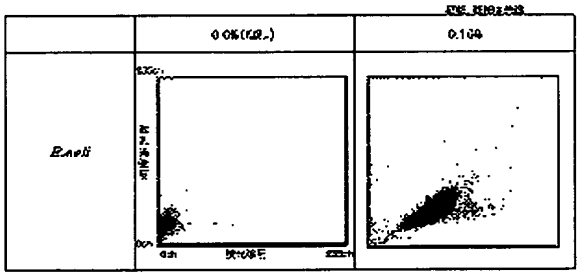
(22)出願日　平成12年３月22日(2000.3.22)

(71)出願人　390014960
シスメックス株式会社
神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号
(72)発明者　井上　淳也
神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号
シスメックス株式会社内
(72)発明者　池内　喜郎
神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号
シスメックス株式会社内
(74)代理人　100088867
弁理士　西野　卓嗣

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細菌の染色方法及び検出方法

(57)【要約】
【課題】　試料中に夾雑物が存在しても、培養することなしに細菌を迅速に効率よく検出できるような染色方法ならびに、検出方法を提供する
【解決手段】　ｐＨ2.0～4.5において、細菌を含む試料に、カチオン性界面活性剤を作用させて細菌の色素透過性を亢進させ、さらに、色素を作用させて細菌を染色する。



1

【特許請求の範囲】

【請求項１】　ｐＨ2.0～4.5において．細菌を含む試料に．カチオン性界面活性剤を作用させて細菌の色素透過性を亢進させ．さらに、色素を作用させて細菌を染色することからなる．細菌の染色方法。

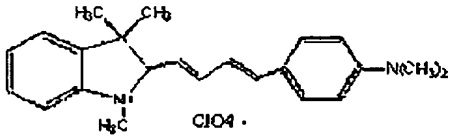
【請求項２】　前記色素が．少なくとも細菌を構成する成分の一つと結合し、蛍光を発する蛍光色素である請求項１記載の細菌の染色方法。

【請求項３】　前記蛍光色素が、以下の群から選択される少なくとも１つである請求項２記載の細菌の染色方法。；

（１）チアゾールオレンジ

（２）

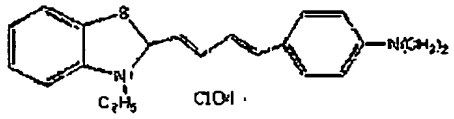
【化１】



2

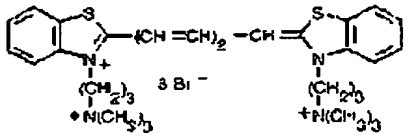
＊（３）

【化２】



（４）

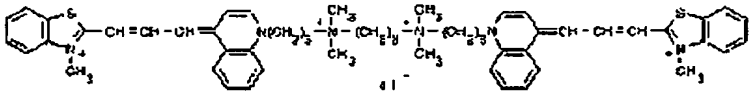
【化３】



（５）

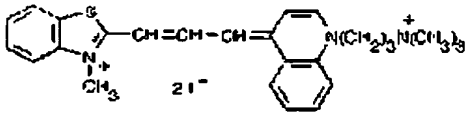
【化４】

＊



（６）

【化５】

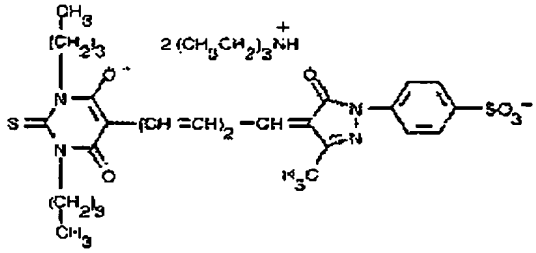


※（８）

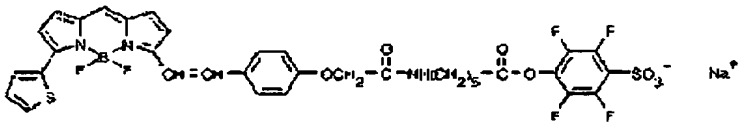
【化７】

（７）

【化６】

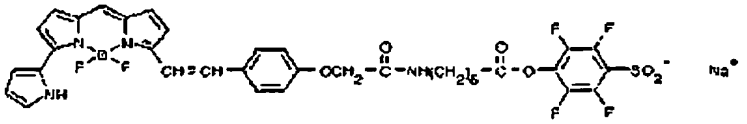


※



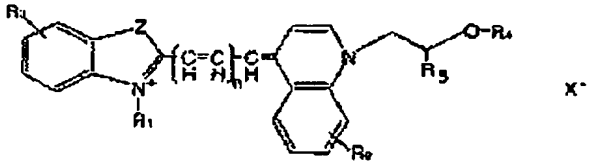
（９）

★ ★【化８】



3　　4

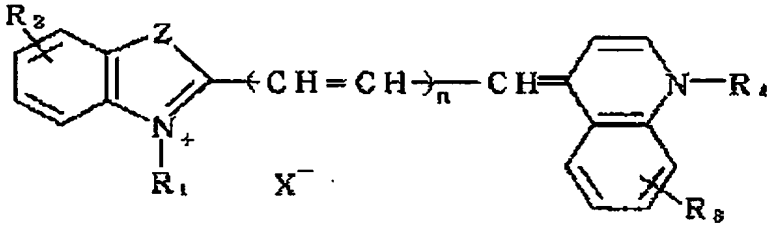
（１０）以下の一般式で表される化合物：　　＊　＊【化９】



（式中、R_1は水素原子又は炭素数１～３のアルキル基；R_2及びR_3は水素原子、炭素数１～３のアルキル基又は炭素数１～３のアルコキシ基；R_4は水素原子、アシル基又は炭素数１～３のアルキル基；R_5は水素原子、置換されていてもよい炭素数１～３のアルキル基；※Zは硫黄原子、酸素原子又は炭素数１～３のアルキル基で置換された炭素原子；nは１又は２；X^-はアニオンである）

（１１）以下の一般式で表される化合物：

【化１０】



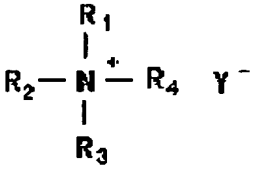
（式中、R_1は水素原子又は炭素数１～１８のアルキル基；R_2及びR_3は水素原子、炭素数１～３のアルキル基又は炭素数１～３のアルコキシ基；R_4は水素原子、アシル基、又は炭素数１～１８のアルキル基；Zは硫黄、酸素、あるいは炭素数１～３のアルキル基を有する炭素であり；nは0，1又は2であり；X^-はアニオンである）。

【請求項４】　前記pHを維持するためにｐＫａ　１～５の緩衝剤を使用する請求項１記載の細菌の染色方法。

【請求項５】　該緩衝剤が、クエン酸塩、リン酸塩、フタル酸塩、グリシン、コハク酸、乳酸、β－アラニン、ε－アミノカプロン酸及びフマル酸からなる群より選択される少なくとも１つである請求項４記載の細菌の染色方法。

【請求項６】　カチオン性界面活性剤が、以下の式で示される四級アンモニウム塩；

【化１１】



（式中、R_1は炭素数８～１８のアルキル基；R_2、R_3及びR_4は同一又は異なって、炭素数１～３のアルキル基またはベンジル基；Y^-はハロゲンイオンである）である請求項１記載の細菌の染色方法。

【請求項７】　四級アンモニウム塩が、デシルトリメチルアンモニウム塩、ドデシルトリメチルアンモニウム塩、テトラデシルトリメチルアンモニウム塩、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム塩及びオクタデシルトリメチルアンモニウム塩からなる群より選択される少なくとも１つである請求項６記載の細菌の染色方法。

【請求項８】　さらに硫酸塩または硝酸塩のうちいずれかの無機塩の共存下で染色を行う請求項１記載の細菌の染色方法。

【請求項９】　以下の工程を含む細菌検出法；

①細菌を含む試料を、カチオン系界面活性剤を含むpH2.0～4.5の水溶液で希釈し、細菌の色素透過性を亢進させる工程

②該試料を蛍光色素を用いて一定時間染色反応させる工程

③前記工程で処理された試料をフローサイトメータの検出部に導入し、染色された細菌の細胞一つ一つに光を照射し、該細胞から発せられる散乱光及び蛍光を測定する工程

④測定した散乱光及び蛍光の信号強度または、粒子の長さを反映するパルス幅に基づいて細菌と他の成分を分離・計数する工程

【請求項１０】　細菌と他の成分を分離して計数する工程が、次の組合せから選ばれた少なくとも一つの組み合わせである請求項７の細菌計数方法

①前方散乱光強度と前方散乱光パルス幅

②前方散乱光強度と蛍光強度

③前方散乱光パルス幅と蛍光強度

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】本発明は、臨床試料中の細菌、とくに好適には尿試料中に存在する細菌の染色方法および検出方法に関する。

【０００２】

【従来の技術】尿中細菌数は感染の有無を判定する上で

臨床診断上、重要なパラメーターである。一般的に、尿路感染症(Urinary Tract Infection)の判定基準として、尿中細菌数が105個/ml以上出現した場合を陽性とする。また103個/ml以下では汚染尿(宮在菌)であるとして陰性としている。104個/ml程度の場合は判定保留域であるが、再検領域とする場合が多い。

【０００３】従来から行われている尿中細菌の確認方法としては、グラム染色した後顕微鏡下で確認する、無染色で顕微鏡下で確認する、蛍光染色した後顕微鏡下で確認する、といった方法などが挙げられる。

【０００４】尿中には夾雑物と言われる臨床上有用ではない粘液糸、結晶、無晶性塩類、細胞の断片がしばしばみられこれらが重要な測定粒子(特に細菌)の妨害となり、細菌数を正確に計数することは困難であった。現実的には104個/ml程度の菌数を精度良く計数する方法は存在しなかった。

【０００５】例えば、グラム染色は、細菌と夾雑物が同時に染色されるため、顕微鏡下において数の少ない細菌の見落としが多い。また染色工程が複数あり、染色に時間を要する(約15分)ため、作業効率が悪かった。

【０００６】また、無染色鏡検は、方法としては迅速であるが、特に球菌状の夾雑物が出現した場合には菌との弁別が不可能である。

【０００７】蛍光染色鏡検については、細菌検出性能は上記二つの方法よりも高いが、細菌以外の夾雑物が侵入した場合に、それらを効果的に除去し、さらに細菌を迅速に染色する方法については開示されていない。

【０００８】なお、標準法である寒天培地法の場合は、菌数の測定に１６時間以上要し、迅速とは言い難い。

【０００９】また、米国特許第４，６２２，２９８号、特開平９－１１９９２６号には蛍光染色された尿試料をフローサイトメータで測定し細菌を検出する方法が提案されているが、いずれも夾雑物を含んだ試料を測定してはいない。さらに、特開平９－３２９５９６号には、尿中の有形成分の分析において、互いに弁別の困難な成分の分析方法として、尿試料を界面活性剤を含む水溶液で処理し、フローサイトメータで測定する方法が記載されているが、細菌と夾雑物を弁別する方法を開示してはいない。

【００１０】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、試料中に夾雑物が存在しても、培養することなしに細菌を迅速に効率よく検出できるような染色方法ならびに、検出方法を提供することを目的とする。

【００１１】

【課題を解決するための手段】本発明の細菌染色方法は、ｐＨ2.0～4.5において、細菌を含む試料に、カチオン性界面活性剤を作用させて細菌の色素透過性を亢進させ、さらに、色素を作用させて細菌を染色することからなる。

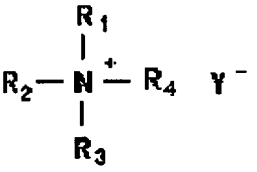
【００１２】

【発明の実施の形態】本発明者らは、上記のｐＨにおいては、（１）細菌が中性やアルカリ性よりも良く染色されること、（２）粘液糸の非特異染色を抑え、かつ粘液糸をある程度溶解させることができること、を見出した。

【００１３】前記ｐＨを維持するために、酸あるいはｐＫａ　１～５の緩衝剤を使用することができる。前記ｐＨ範囲、好ましくはpH2.0～3.0を維持できるものであれば緩衝剤としては特に限定されないが、好適には、クエン酸塩、リン酸塩、フタル酸塩、グリシン、コハク酸、乳酸、β－アラニン、ε－アミノカプロン酸及びフマル酸などが使用できる。使用量は、前記ｐＨ範囲を維持できる量で使用でき、１０～５００mMの範囲で使用できる。

【００１４】カチオン性界面活性剤はとくに限定されないが、好適には以下の式で示される四級アンモニウム塩；

【化１２】



（式中、R_1は炭素数８～１８のアルキル基；R_2、R_3及びR_4は同一又は異なって、炭素数１～３のアルキル基またはベンジル基；Y^-はハロゲンイオンである）が使用できる。

【００１５】例えば、デシルトリメチルアンモニウム塩、ドデシルトリメチルアンモニウム塩、テトラデシルトリメチルアンモニウム塩、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム塩及びオクタデシルトリメチルアンモニウム塩が好適に使用される。使用量については、10～30000mg/l、好ましくは100～3000mg/lが好適である。

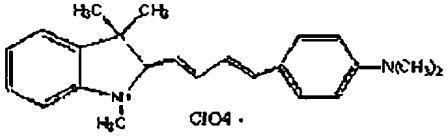
【００１６】細菌を含む試料に、カチオン性界面活性剤を添加することにより、細菌の細胞膜が傷害され、色素が入り込みやすくなる。その結果、細菌の細胞内の物質と色素とが効率よく結合して細菌がよく染色され、夾雑物と弁別しやすくなる。一方、粘液糸や赤血球や細胞の破片などは、溶解あるいは収縮し、細菌の検出への影響が低減されることとなる。

【００１７】色素については、前記ｐＨ域で細菌を染色できるものであれば特に制限されない。濃度については、色素ごとに好適な濃度は異なるが、例えば、0.1～100ppm（最終濃度）の範囲で使用できる。なお、細菌の検出能力の点から、使用する色素は、少なくとも細菌を構成する成分の一つと結合し、蛍光を発する蛍光色素を使うのが有利である。例えば、以下の（１）～（１１）の色素が使用できる。

【００１８】（１）チアゾールオレンジ

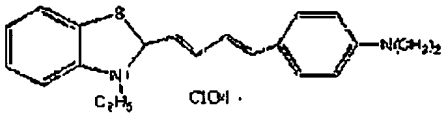
【００１９】（２）

【化１３】



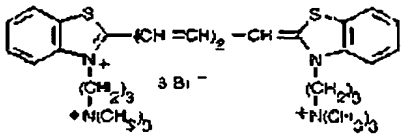
【００２０】（３）

【化１４】



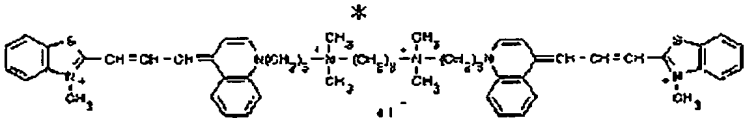
＊【００２１】（４）

【化１５】



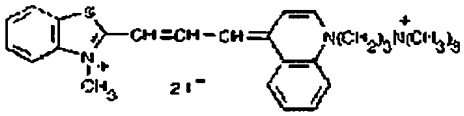
【００２２】（５）

【化１６】



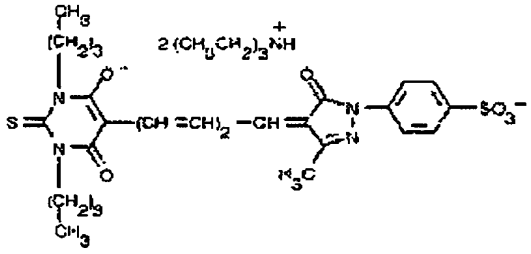
【００２３】（６）

【化１７】



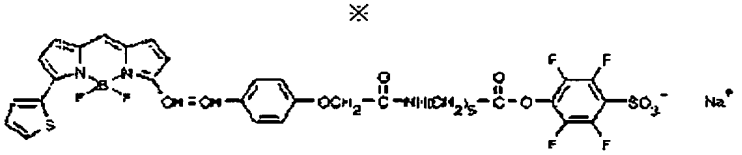
【００２４】（７）

【化１８】



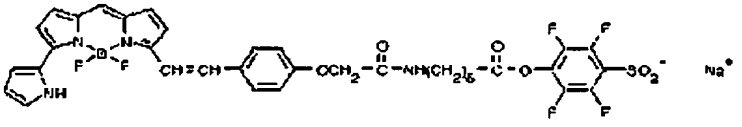
※【００２５】（８）

【化１９】



【００２６】（９）

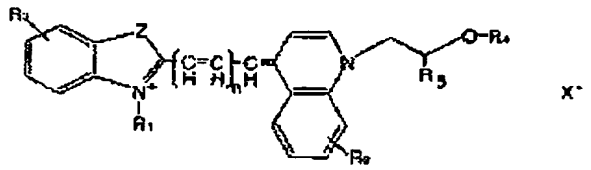
★40★【化２０】



【００２７】（１０）以下の一般式で表される化合物：

【化２１】

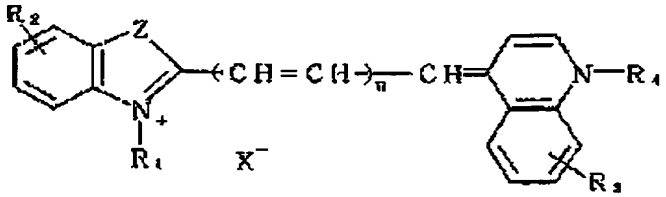
9　　10



（式中、R1は水素原子又は炭素数１～３のアルキル基；R2及びR3は水素原子．炭素数１～３のアルキル基又は炭素数１～３のアルコキシ基；R4は水素原子、アシル基又は炭素数１～３のアルキル基；R5は水素原子．置換されていてもよい炭素数１～３のアルキル基；＊２は磁黄原子．酸素原子又は炭素数１～３のアルキル基で置換された炭素原子；ｎは１又は２；X-はアニオンである）

【００２８】（１１）以下の一般式で表される化合物：

【化２２】



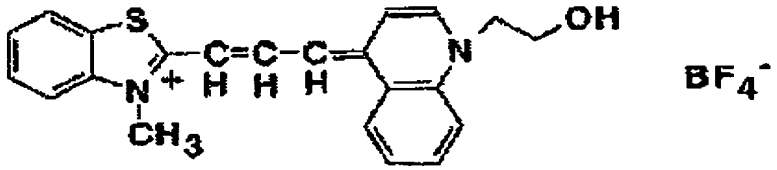
（式中、R1は水素原子又は炭素数１～１８のアルキル基；R2及びR3は水素原子．炭素数１～３のアルキル基又は炭素数１～３のアルコキシ基；R4は水素原子、アシル基、又は炭素数１～１８のアルキル基；Zは磁黄、酸素．あるいは炭素数１～３のアルキル基を有する炭素であり；ｎは０，1又は２であり；X-はアニオンである）。

【００２９】これらの色素のうち、（１）は市販品を入手できる。（２）、（３）は日本感光色素研究所（株）※より入手できる。（５）～（９）は．Molecular Probes,Inc.より入手できる。

【００３０】また、（１０）は、特開平９－１０４６８３号に、（１１）は、特開平１０－３１９０１０号に製造方法が記載されている。

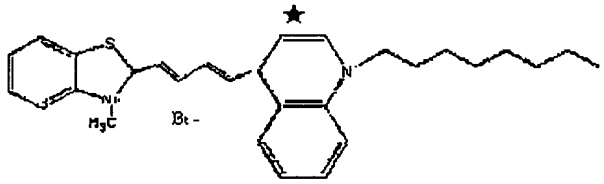
【００３１】なお、（１０）の一般式で示される色素のうち．特に、次の色素；

【化２３】



【００３２】また、（１１）の一般式で示される色素のうち．特に次の色素；

★【化２４】



が好適である。

【００３３】さらに、硫酸塩または硝酸塩のうちいずれかの無機塩の共存下で染色を行うことで、細菌の蛍光染色性を増大させ．夾雑物の非特異染色を抑制することができるので好ましい。使用量としては．10～500mM、好ましくは50～200mMの濃度範囲で使用できる。

【００３４】本発明の染色法では、尿試料で確認される細菌．例えば．E.coli，Staphyrococcus sp.，Pseudomonas sp.，Klebsiella sp.，Serratia sp.，Enterobacter sp.，Enterococcus sp.，Streptpococcus sp.及びCitrobacter sp.などが好適に染色される。また、尿試料に限らず、血液．髄液など他の臨床試料にも適用できる。

【００３５】本発明の染色法は、試料．カチオン性界面活性剤を含む水溶液、色素を含む溶液を混合することで実施できる。なお、色素はカチオン性界面活性剤を含む水溶液中に含有させてもよいが、使用する色素が水溶液中では不安定な場合には．色素をメタノール、エタノールやエチレングリコールなどの水溶性有機溶媒中に溶解しておき、使用時にカチオン性界面活性剤を含む水溶液と混合するようにしておけば、色素の保存安定性を向上

させることができる。

【００３６】反応温度・時間は特に限定されないが、温度は、１５～５０℃、時間は、混合直後から１５分間で実施できる。

【００３７】本発明の染色法により染色された試料は、顕微鏡や画像認識装置で観察して細菌を検出することもできるが、フローサイトメトリによって細菌を高精度で検出・計数することができる。

【００３８】すなわち本発明の細菌の検出方法は、①細菌を含む試料を、カチオン性界面活性剤を含むpH2.0～4.5の水溶液で希釈し、細菌の色素透過性を亢進させ、②該試料を蛍光色素を用いて一定時間染色反応させ、③前記工程で処理された試料をフローサイトメータの検出部に導入し、染色された細菌の細胞一つ一つに光を照射し、該細胞から発せられる散乱光及び蛍光を測定し、④測定した散乱光及び蛍光の信号強度または、粒子の長さを反映するパルス幅に基づいて細菌と他の成分を分離＊・計数する工程を含む。

【００３９】細菌と他の成分を分離・計数するには、測定によって得られた信号を組み合わせて行うことができる。信号の組み合わせとして例えば、前方散乱光強度と前方散乱光パルス幅、前方散乱光強度と蛍光強度、前方散乱光パルス幅と蛍光強度の組み合わせが挙げられる。好適には、例えばまず前方散乱光強度と前方散乱光パルス幅の組み合わせで２次元分布図（スキャッタグラム）を作成し、分布図上で細菌を含む集団を特定してゲーティングを行い、主に粘液糸を分離し、さらに、ゲーティングされた集団に対して、前方散乱光強度と蛍光強度の組み合わせで、さらに２次元分布図を作成し、蛍光強度の違いから細菌と他の成分（結晶や細胞の破片など）を分離する。概念図を図７に示す。

【００４０】

【実施例】以下に好適な実施例を示すが、本発明はこれに限定されない。

実施例１

試薬組成

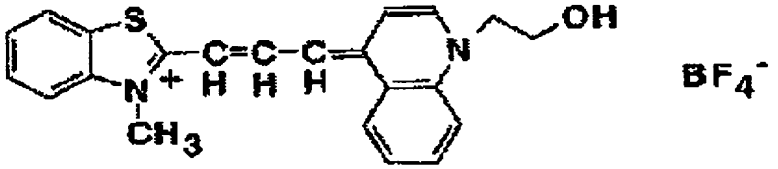
（希釈液）

クエン酸	100mM
NaOH	pH4.1になる量
テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイド	0.1%(w/v)

（染色液）

色素Ａ（以下の構造式）　40ppm（エチレングリコール溶液）

【化２５】



【００４１】培養大腸菌を含む試料100μlに、上記組成の希釈液1000μl及び染色液を色素Ａの最終濃度が1ppmになるように添加し、40℃、30秒間反応させ、赤色半導体レーザーを光源とするフローサイトメータで散乱光及び蛍光の測定を行った（分析容量7.8μl）。対照として、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを含まない試薬を用いて測定を行った。結果を図１に示す。

※【００４２】テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを含まない試薬を用いた場合（図中左）は、蛍光強度が30ch以下で、大腸菌はほとんど染色されていなかった。一方、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを0.1%(w/v)を含む場合は（図中右）、大腸菌の集団が蛍光強度で50ch以上に分布し、染色性が増大していることが確認された。

【００４３】

実施例２

試薬組成

（希釈液）

クエン酸	100mM(pH2.5)
テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイド	0.1%(w/v)
硫酸ナトリウム	90mM

（染色液）

実施例１と同じ

【００４４】上記組成の試薬を用いて、各培養細菌（E. coli, S.aureus, K.pneumoniae, C.freundii, E.faecalis）を含む試料を実施例１と同様に測定した。結果を図２に示す。

【００４５】各細菌とも、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを含まない場合は、蛍光強度が低く、ほとんど染色されていないが、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを添加することによって、蛍光強度が増大し、よく染色されていることが確認された。また、大腸菌測定において、硫酸ナトリウムをさらに添加している場合（本実施例）と、硫酸ナトリウムを含まない場合（実施例１）と比べて、本実施例においては、蛍光強度がより増大しており、硫酸ナトリウムの添加による効果が認められた。

【００４６】実施例３

希釈直線性

大腸菌を培養し、希釈係数1,10,100,1000,10000,100000の希釈試料を作成し、実施例２と同じ試薬を用いて同様に測定を行った。結果を図３に示す。なお、菌数は、前方散乱光強度と蛍光強度の組み合わせで２次元分布図を作成し、分布図上で細菌を含む集団を特定してゲーティングを行うことにより求めた。図３に示したように、菌数約10^2～10^7個/mlの範囲で良好な直線性が得られた。

【００４７】実施例４

尿試料の測定

実施例２と同じ試薬を用いて尿検体６２検体について測定を行い、対照としたCLED培地による培養法での測定結果との相関について検討した。

【００４８】菌数の測定は、まず前方散乱光強度と前方散乱光パルス幅の組み合わせで２次元分布図を作成し、分布図上で細菌を含む集団を特定してゲーティングを行い、さらに、ゲーティングされた集団について、前方散乱光強度と蛍光強度の組み合わせで、さらに２次元分布図を作成し、蛍光強度の違いから細菌の領域を特定し、特定された領域内の数を求めた。結果を図４に示す。

【００４９】CLED培地による培養法での結果と良好な相関が得られた。なお、図４において、縦軸にいくつか点が見られるが、これはCLED培地による培養法では、生きた細菌のみ検出するのに対し、本発明では、培地では生えにくい菌（静菌；薬剤などの影響により生育しにくくなっている菌）及び死菌も検出しているためと考えられる。

【００５０】実施例５

血液培養試料の測定

細菌を含む血液試料を血液培養ボトルを用いて培養し、培養液を測定した。グラム陰性桿菌（Pseudomonas sp.）の結果を図５に、グラム陽性球菌（Staphyrococcus sp.）の結果を図６に示す。なお、菌数は、前方散乱光強度と蛍光強度の組み合わせで２次元分布図を作成し、分布図上で細菌を含む集団を特定してゲーティングを行うことにより求めた。対照は、KOBA 10グリッド（HYCOR BIOMEDICAL INC.）を用いて目視で確認した。グラム陰性桿菌は、本発明では、5.2×10^7/mlに対し、目視法では、2.9×10^7/ml．また、グラム陽性球菌では、本発明では2.3×10^6/mlに対し、目視法では、8.8×10^7/mlであった。

【００５１】

【発明の効果】本発明の染色方法によれば、水系で染色されるため、グラム染色のような乾燥固定は必ずしも必要としない。このため、染色工程を含めて短時間で測定用試料が調製でき、染色時間の大幅な短縮が可能である。

【００５２】また、検体と試薬を混合するだけの簡単な操作で実施でき、グラム染色のような熟練は必要でない。さらに、染色工程が簡単であるため、染色から測定（フローサイトメトリや画像解析など）までの自動化が容易である。

【００５３】さらに、本発明の細菌検出方法によれば、夾雑物の影響を受けることなく、精度よく細菌を計数することが可能である。具体的には、10^1個/ml程度の菌数を計数可能である。

【００５４】また、培地では生えにくい菌（静菌作用のある検体など）についても確実に捉えることができる。

【図面の簡単な説明】

【図１】本発明の実施例１において、培養大腸菌を測定したときの蛍光強度－前方散乱光強度のスキャッタグラムである。

【図２】本発明の実施例２において、培養した各種細菌を測定したときの蛍光強度－前方散乱光強度のスキャッタグラムである。

【図３】本発明の実施例３において、希釈直線性試験の結果を示したグラフである。

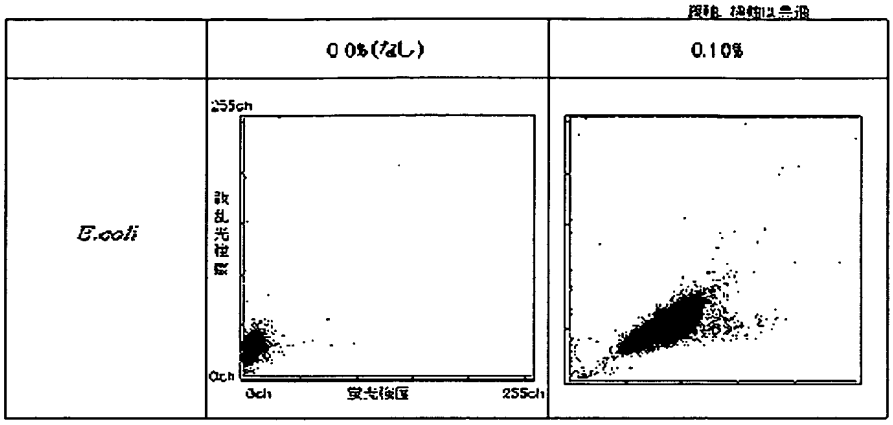
【図４】本発明の実施例４において、本発明の方法とCLED培地での測定結果との相関図である。

【図５】本発明の実施例５において、グラム陰性桿菌の測定結果を示したスキャッタグラムである。

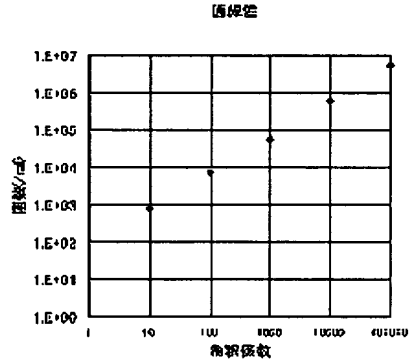
【図６】本発明の実施例６において、グラム陽性球菌の測定結果を示したスキャッタグラムである。

【図７】本発明における細菌の検出方法の概念図である。

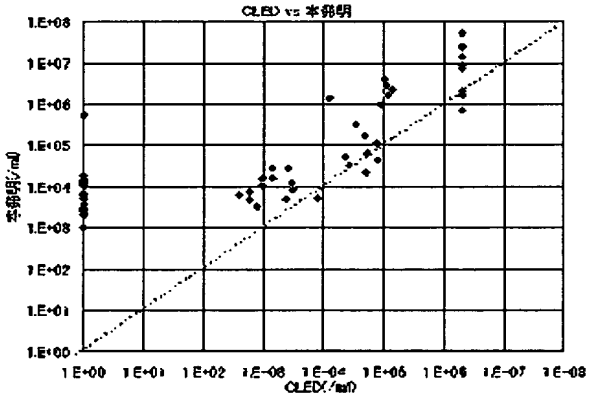
【図１】


0.0%(なし)
0.1%
E.coli
255ch
0ch
0ch
255ch

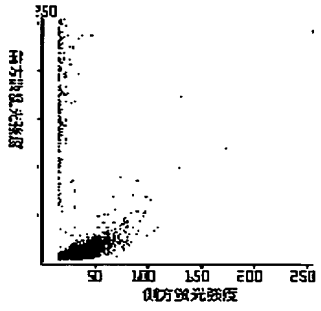
【図３】


1.E+07
1.E+06
1.E+05
1.E+04
1.E+03
1.E+02
1.E+01
1.E+00
1
10
100
1000
10000
100000

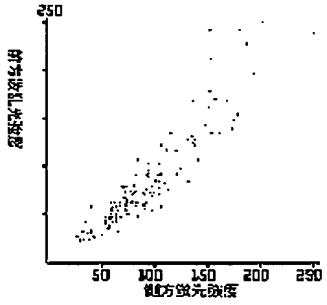
【図４】


1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1.E+04
1.E+03
1.E+02
1.E+01
1.E+00
1.E+00
1.E+01
1.E+02
1.E+03
1.E+04
1.E+05
1.E+06
1.E+07
1.E+08

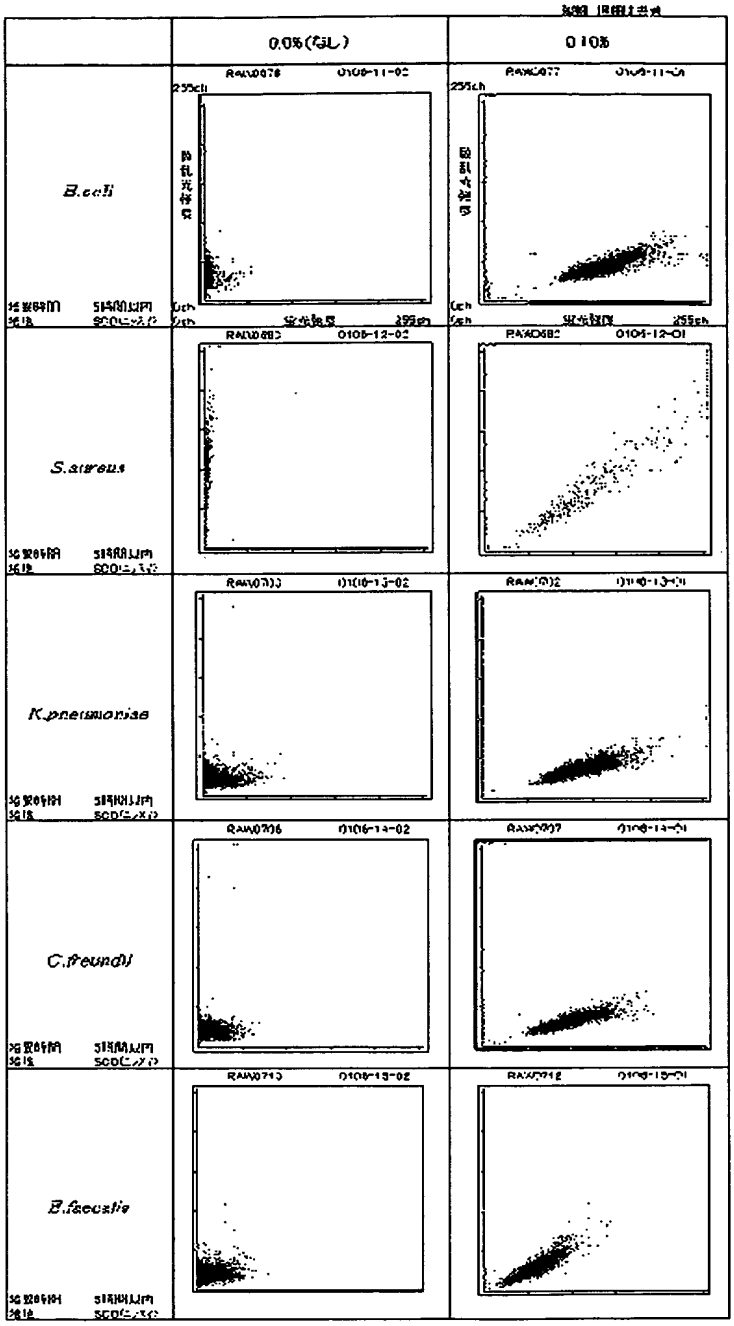
【図５】


350
50
100
150
200
250

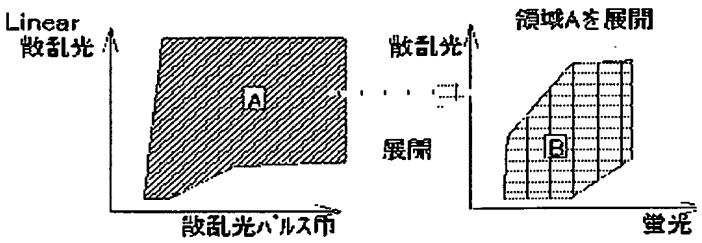
【図６】


250
50
100
150
200
250

【図２】



【図７】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.'	識別記号	Ｆｉ	ﾃｰﾏｺｰﾄﾞ(参考)
(Ｃ１２Ｑ　1/04 Ｃ１２Ｒ　1:01)		(Ｃ１２Ｑ　1/04 Ｃ１２Ｒ　1:01)	

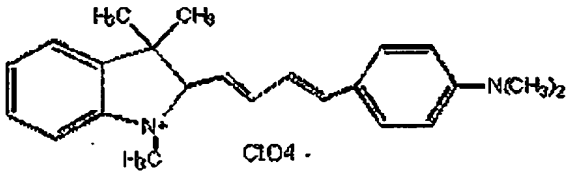
(72)発明者　河島　康之
神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号
シスメックス株式会社内

Ｆターム(参考)　2G045 AA28 BB24 BB51 CB01 CB03
FA11 FA18 FB12 GC22
4B063 QA01 QQ06 QR50 QR64 QR66
QS08 QS20 QS22 QS36 QX02

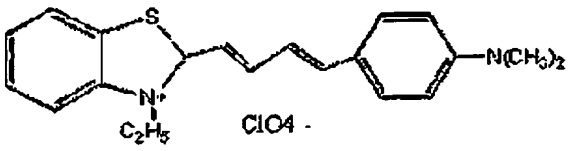
【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成１５年８月１２日（２００３．８．１２）

【公開番号】特開２００１－２５８５９０（Ｐ２００１－２５８５９０Ａ）
【公開日】平成１３年９月２５日（２００１．９．２５）
【年通号数】公開特許公報１３－２５８６
【出願番号】特願２０００－８０９９８（Ｐ２０００－８０９９８）
【国際特許分類第７版】
C12Q 1/06
1/04
G01N 33/48
//(C12Q 1/06
C12R 1:01)
(C12Q 1/04
C12R 1:01)
【ＦＩ】
C12Q 1/06
1/04
G01N 33/48 P

【手続補正書】
【提出日】平成１５年３月２５日（２００３．３．２５）
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】特許請求の範囲
【補正方法】変更
【補正内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】　ｐＨ２．０～４．５において、細菌を含む試料に、カチオン性界面活性剤を作用させて細菌の色素透過性を亢進させ、さらに、色素を作用させて細菌を＊染色することからなる、細菌の染色方法。
【請求項２】　前記色素が、少なくとも細菌を構成する成分の一つと結合し、蛍光を発する蛍光色素である請求項１記載の細菌の染色方法。
【請求項３】　前記蛍光色素が、以下の群から選択される少なくとも１つである請求項２記載の細菌の染色方法。：
（１）チアゾールオレンジ
（２）
【化１】



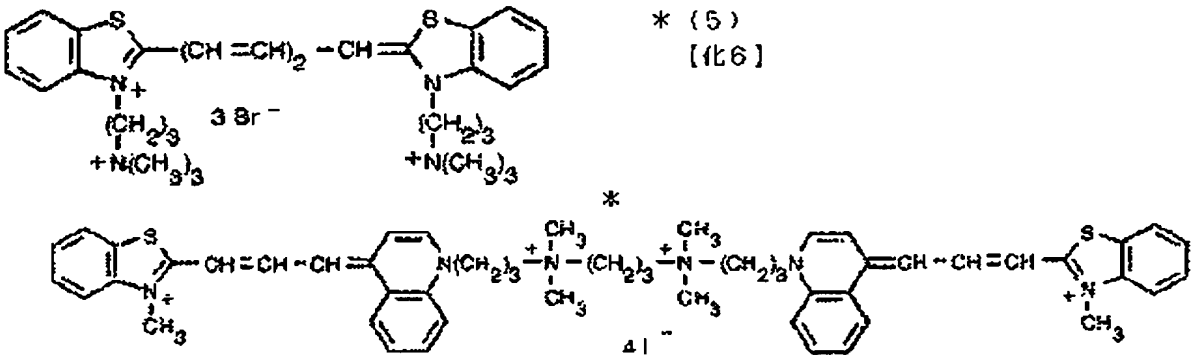
（３）　※
【化２】　※



（４）
【化５】

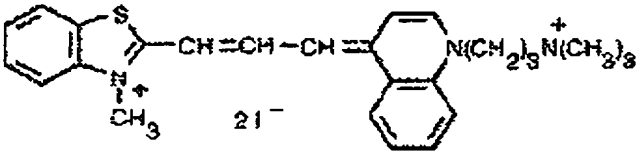
＊（５）

【化６】



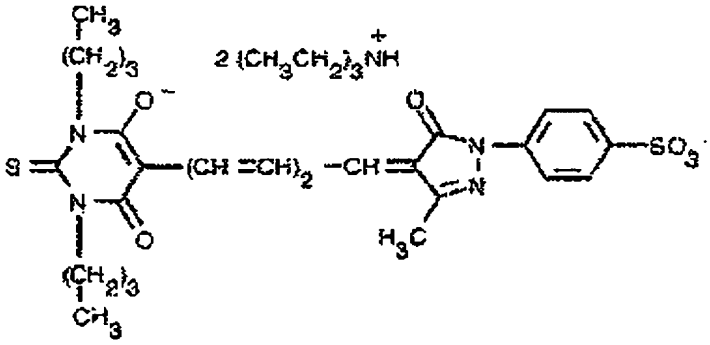
（６）　※

【化７】　※



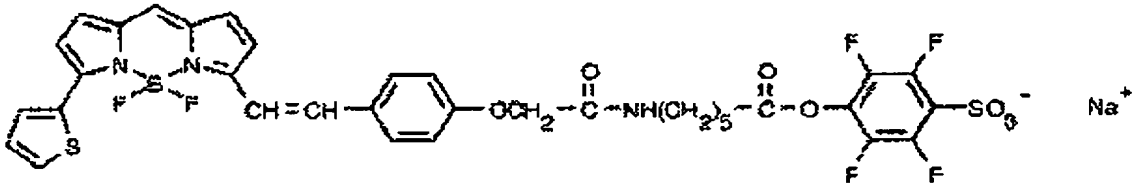
（７）　★

【化８】　★



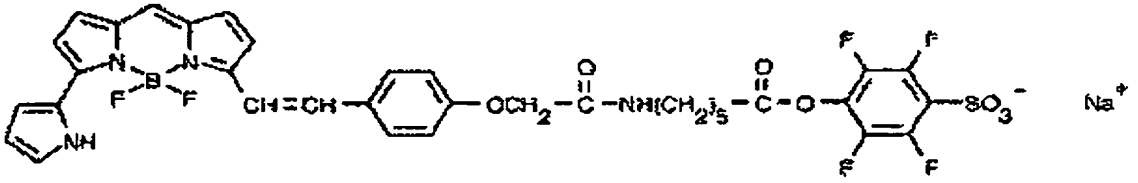
（８）　☆

【化９】　☆



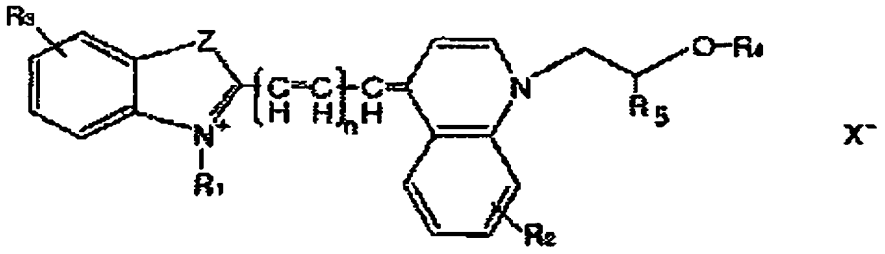
（９）　◆

【化１０】　◆



（１０）以下の一般式で表される化合物：

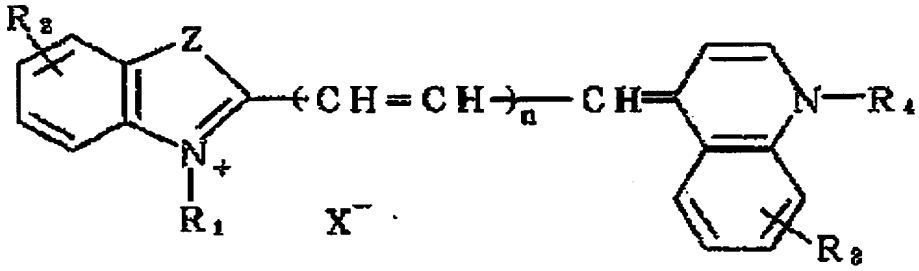
【化１１】



（式中、Ｒ１は水素原子又は炭素数１～３のアルキル基；Ｒ２及びＲ３は水素原子、炭素数１～３のアルキル基又は炭素数１～３のアルコキシ基；Ｒ４は水素原子、アシル基又は炭素数１～３のアルキル基；Ｒ５は水素原子、置換されていてもよい炭素数１～３のアルキル基；Ｚは硫黄原子、酸素原子又は炭素数１～３のアルキル基＊で置換された炭素原子；ｎは１又は２；Ｘ－はアニオンである）

（１１）以下の一般式で表される化合物；

【化１２】



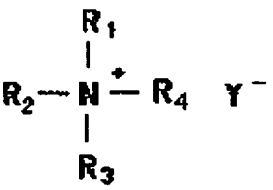
（式中、Ｒ１は水素原子又は炭素数１～１８のアルキル基；Ｒ２及びＲ３は水素原子、炭素数１～３のアルキル基又は炭素数１～３のアルコキシ基；Ｒ４は水素原子、アシル基、又は炭素数１～１８のアルキル基；Ｚは硫黄、酸素、あるいは炭素数１～３のアルキル基を有する炭素であり；ｎは０，１又は２であり；Ｘ－はアニオンである）。

【請求項４】　前記ｐＨを維持するためにｐＫａ　１～５の緩衝剤を使用する請求項１記載の細菌の染色方法。

【請求項５】　該緩衝剤が、クエン酸塩、リン酸塩、フタル酸塩、グリシン、コハク酸、乳酸、β－アラニン、ε－アミノカプロン酸及びフマル酸からなる群より選択される少なくとも１つである請求項４記載の細菌の染色方法。

【請求項６】　カチオン性界面活性剤が、以下の式で示される四級アンモニウム塩；

【化１３】



（式中、Ｒ１は炭素数８～１８のアルキル基；Ｒ２、Ｒ３及びＲ４は同一又は異なって、炭素数１～３のアルキル基またはベンジル基；Ｙ－はハロゲンイオンである）である請求項１記載の細菌の染色方法。

【請求項７】　四級アンモニウム塩が、デシルトリメチルアンモニウム塩、ドデシルトリメチルアンモニウム塩、テトラデシルトリメチルアンモニウム塩、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム塩及びオクタデシルトリメチルアンモニウム塩からなる群より選択される少なくとも１つである請求項６記載の細菌の染色方法。

【請求項８】　さらに硫酸塩または硝酸塩のうちいずれかの無機塩の共存下で染色を行う請求項１記載の細菌の染色方法。

【請求項９】　以下の工程を含む細菌検出法；

①細菌を含む試料を、カチオン系界面活性剤を含むｐＨ２．０～４．５の水溶液で希釈し、細菌の色素透過性を亢進させる工程

②該試料を蛍光色素を用いて一定時間染色反応させる工程

③前記工程で処理された試料をフローサイトメータの検出部に導入し、染色された細菌の細胞一つ一つに光を照射し、該細胞から発せられる散乱光及び蛍光を測定する工程

④測定した散乱光及び蛍光の信号強度または、粒子の長さを反映するパルス幅に基づいて細菌と他の成分を分離・計数する工程。

【請求項１０】　細菌と他の成分を分離して計数する工程が、次の組合せから選ばれた少なくとも一つの組み合わせである請求項７の細菌計数方法

①前方散乱光強度と前方散乱光パルス幅

②前方散乱光強度と蛍光強度

③前方散乱光パルス幅と蛍光強度。

【請求項１１】　（１）カチオン性界面活性剤を含むｐＨ２．０～４．５の水溶液、（２）色素を含む溶液からなる細菌の染色用試薬。

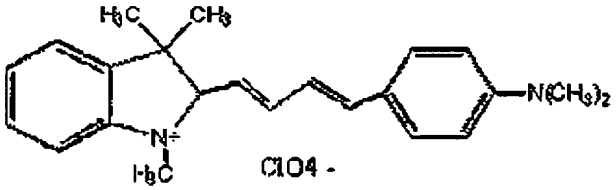
【請求項１２】　前記色素が、少なくとも細菌を構成する成分の一つと結合し、蛍光を発する蛍光色素である請求項１１記載の細菌の染色用試薬。

【請求項１３】　前記蛍光色素が、以下の群から選択される少なくとも１つである請求項１２記載の細菌の染色用試薬。；

（１）チアゾールオレンジ

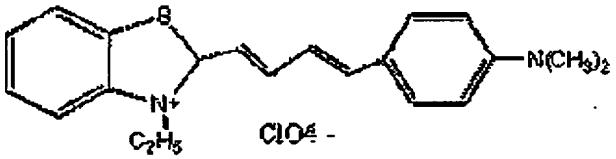
（２）

【化２６】



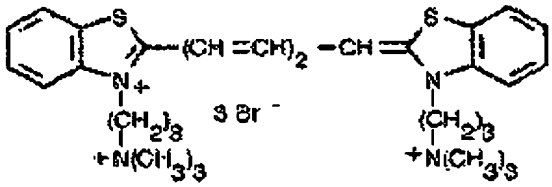
（３）　※

【化２７】　※

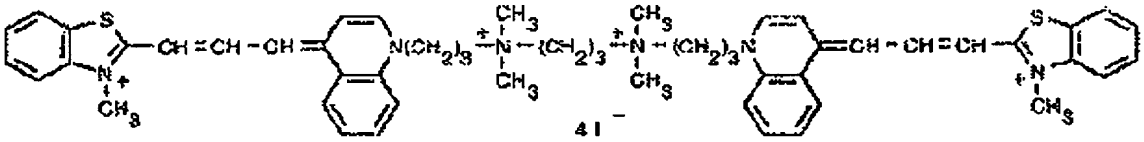


（４）　★（５）

【化２８】　【化２９】

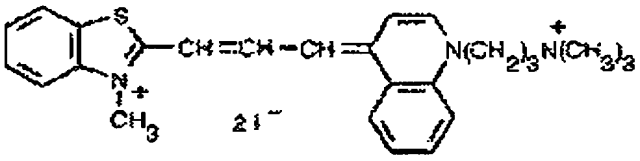


★



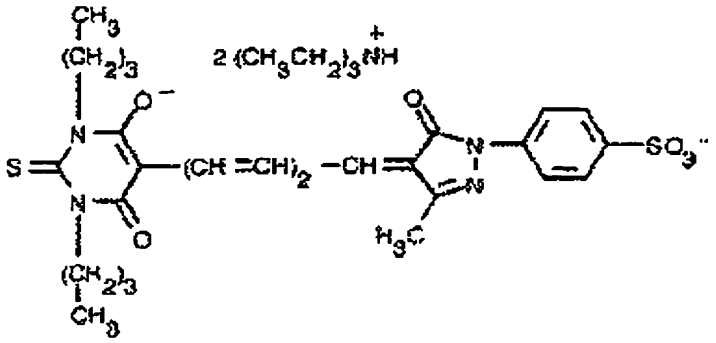
（６）　☆

【化３０】　☆



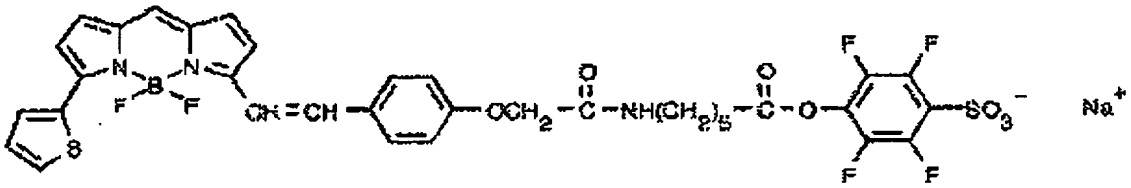
（７）

【化３１】



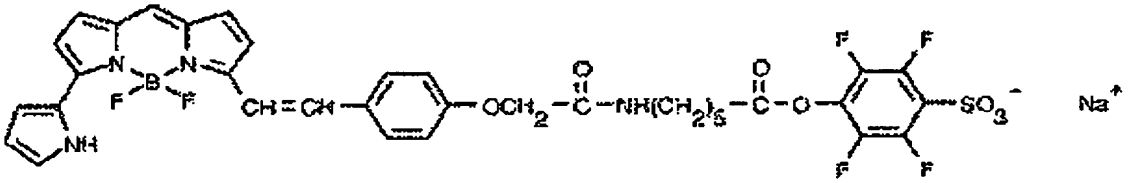
（８）　　＊

【化３２】　　＊



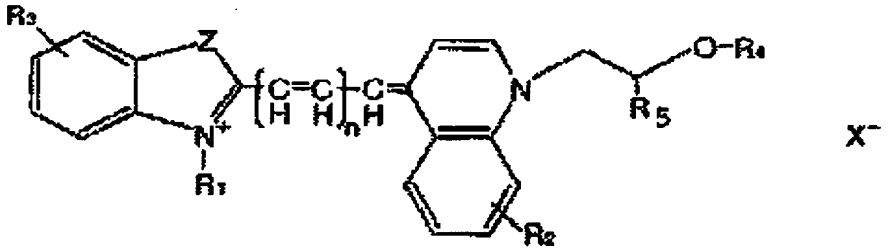
（９）　　※

【化３３】　　※



（１０）以下の一般式で表される化合物：　　★

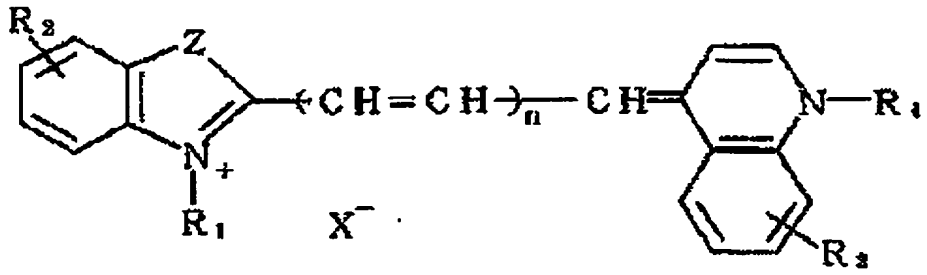
【化３４】　　★



（式中、Ｒ１は水素原子又は炭素数１～３のアルキル基；Ｒ２及びＲ３は水素原子、炭素数１～３のアルキル基又は炭素数１～３のアルコキシ基；Ｒ４は水素原子、アシル基又は炭素数１～３のアルキル基；Ｒ５は水素原子、置換されていてもよい炭素数１～３のアルキル基；Ｚは硫黄原子、酸素原子又は炭素数１～３のアルキル基で置換された炭素原子；ｎは１又は２；Ｘ－はアニオンである）

（１１）以下の一般式で表される化合物：

【化３５】



（式中、Ｒ１は水素原子又は炭素数１～１８のアルキル基；Ｒ２及びＲ３は水素原子、炭素数１～３のアルキル基又は炭素数１～３のアルコキシ基；Ｒ４は水素原子、アシル基、又は炭素数１～１８のアルキル基；Ｚは硫黄、酸素、あるいは炭素数１～３のアルキル基を有する炭素であり；ｎは０，１又は２であり；Ｘ－はアニオンである）。

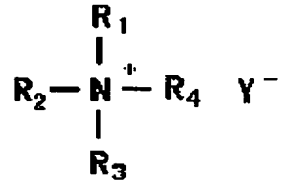
【請求項１４】　前記ｐＨを維持するためにｐＫａ　１～５の緩衝剤を使用する請求項１１記載の細菌の染色用試薬。

【請求項１５】　該緩衝剤が、クエン酸塩、リン酸塩、フタル酸塩、グリシン、コハク酸、乳酸、β－アラニン、ε－アミノカプロン酸及びフマル酸からなる群より選択される少なくとも１つである請求項１４記載の細菌の染色用試薬。

【請求項１６】　カチオン性界面活性剤が、以下の式で示される四級アンモニウム塩

【化３６】

＊



（式中、Ｒ１は炭素数８～１８のアルキル基；Ｒ２、Ｒ３及びＲ４は同一又は異なって、炭素数１～３のアルキル基またはベンジル基；Ｙ－はハロゲンイオンである）である請求項１１記載の細菌の染色用試薬。

【請求項１７】　四級アンモニウム塩が、デシルトリメチルアンモニウム塩、ドデシルトリメチルアンモニウム塩、テトラデシルトリメチルアンモニウム塩、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム塩及びオクタデシルトリメチルアンモニウム塩からなる群より選択される少なくとも１つである請求項１６記載の細菌の染色用試薬。

【請求項１８】　さらに燐酸塩または硝酸塩のうちいずれかの無機塩を含む請求項１１記載の細菌の染色用試薬。

＊

【手続補正書】

【提出日】平成１５年３月２６日（２００３．３．２６）

【手続補正１】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項３

【補正方法】変更

【補正内容】

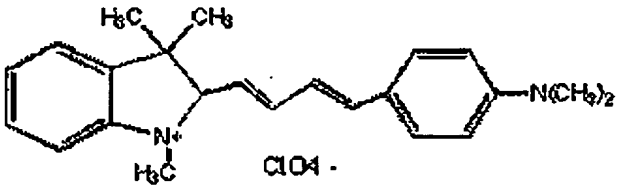
※【請求項３】　前記蛍光色素が、以下の群から選択される少なくとも１つである請求項２記載の細菌の染色方法。；

（１）チアゾールオレンジ

（２）

【化１】

※

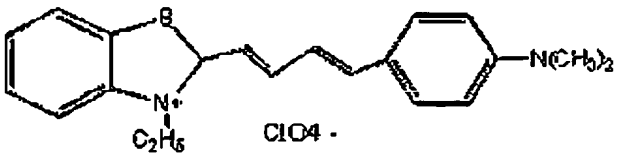


（３）

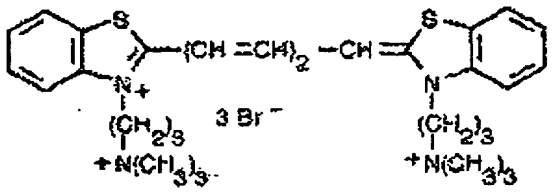
【化２】

★

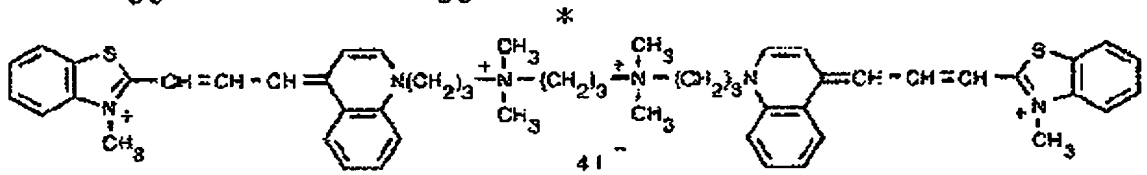
★



（４）
【化３】

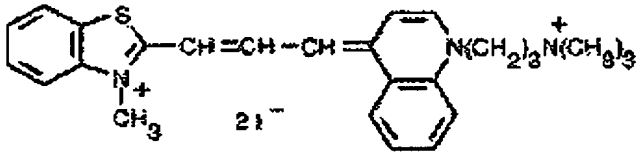


＊（５）
【化４】



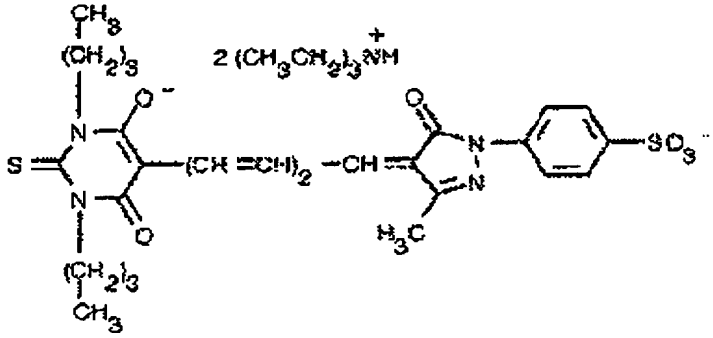
（６）
【化５】

※



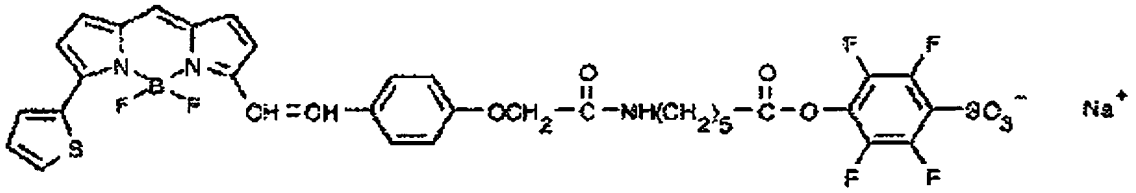
（７）
【化６】

★

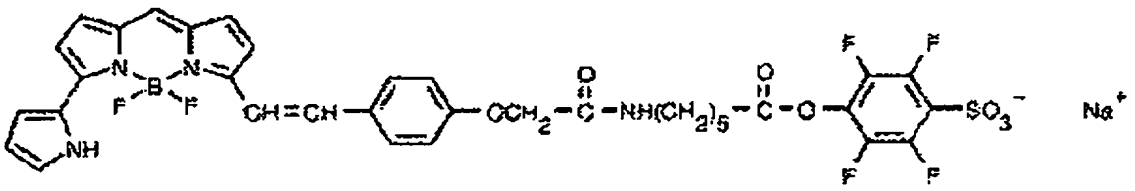


（８）
【化７】

☆

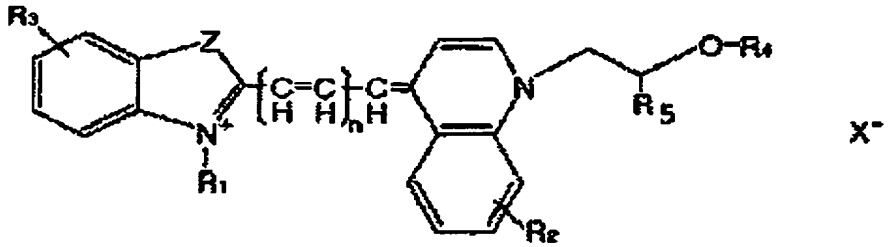


（９）
【化８】



（１０）以下の一般式で表される化合物：　　＊

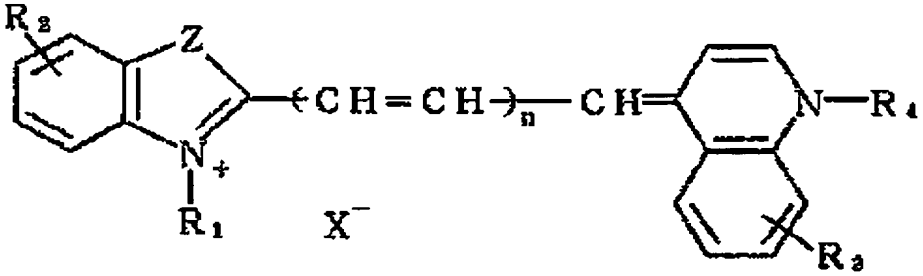
【化９】　　＊



（式中、Ｒ１は水素原子又は炭素数１～３のアルキル基；Ｒ２及びＲ３は水素原子、炭素数１～３のアルキル基又は炭素数１～３のアルコキシ基；Ｒ４は水素原子、アシル基又は炭素数１～３のアルキル基；Ｒ５は水素原子、置換されていてもよい炭素数１～３のアルキル基；Ｚは硫黄原子、酸素原子又は炭素数１～３のアルキル基※で置換された炭素原子；ｎは１又は２；Ｘ－はアニオンである）

（１１）以下の一般式で表される化合物：

【化１０】



（式中、Ｒ１は水素原子又は炭素数１～１８のアルキル基；Ｒ２及びＲ３は水素原子、炭素数１～３のアルキル基又は炭素数１～３のアルコキシ基；Ｒ４は水素原子、アシル基、又は炭素数１～１８のアルキル基；Ｚは硫黄、酸素、あるいは炭素数１～３のアルキル基を有する炭素であり；ｎは０，１又は２であり；Ｘ－はアニオンである）。

【手続補正２】

【補正対象書類名】明細書

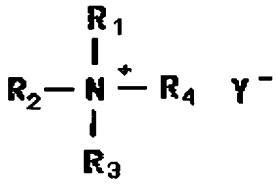
【補正対象項目名】請求項６

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項６】　カチオン性界面活性剤が、以下の式で示される四級アンモニウム塩；

【化１１】



（式中、Ｒ１は炭素数８～１８のアルキル基；Ｒ２、Ｒ３及びＲ４は同一又は異なって、炭素数１～３のアルキル基またはベンジル基；Ｙ－はハロゲンイオンである）である請求項１記載の細菌の染色方法。

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **2001-258590**
(43)Date of publication of application : **25.09.2001**

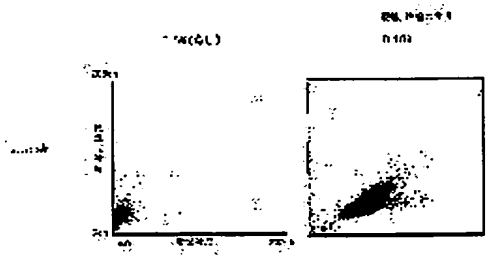
(51)Int.Cl. C12Q 1/06
C12Q 1/04
G01N 33/48
//(C12Q 1/06
C12R 1:01)
(C12Q 1/04
C12R 1:01)

(21)Application number : **2000-080998**
(22)Date of filing : **22.03.2000**

(71)Applicant : **SYSMEX CORP**
(72)Inventor : **INOUE JUNYA**
IKEUCHI YOSHIO
KAWASHIMA YASUYUKI

(54) METHOD FOR DYEING BACTERIUM AND METHOD FOR DETECTING THE BACTERIUM

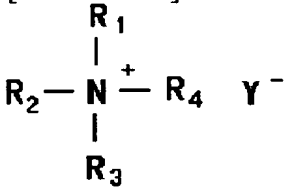
(57)Abstract:
PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for dyeing a bacterium, which enables the rapid and efficient detection of the bacterium without culturing the bacterium, even when impurities exist in a specimen, and to provide a method for detecting the bacterium.
SOLUTION: This method for dyeing the bacterium, comprising allowing a cationic surfactant to act on a specimen containing the bacterium at pH 2.0 to 4.5 to stimulate the pigment permeability of the bacterium, and then further allowing a pigment to act on the bacterium to dye the bacterium with the pigment.



DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]
[0001]
[Field of the Invention]This invention relates to the dyeing method and detecting method of the bacteria in a clinical sample, and the bacteria which exist in a urine sample suitably especially.
[0002]
[Description of the Prior Art]When the bacterial count in urine judges the existence of infection, it is an important parameter on a clinical diagnosis. Generally, the case where 105 or more bacterial counts/ml in urine appear is made into a positivity as a judging standard of urinary tract infection (Urinary Tract Infection). It is considered as negativity noting that it is contamination urine (normal bacterial flora) in 103 or less pieces/ml. About 104 cases/ml are made into re-****** in many cases, although it is a judgment suspension region.
[0003]The method of checking under a microscope as the check method of the bacteria in urine currently performed from the former, after [which is checked under a microscope by no dyeing / which is checked under a microscope] carrying out Gram's stain, and carrying out fluorescent staining, etc. are mentioned.
[0004]It was difficult to often see in urine the fragment of mucus thread which is not useful, a crystal, amorphous salts, and a cell on clinical [which is called impurity], and for these to serve as disturbance of important measurement particles (especially bacteria), and to calculate a bacterial count correctly. The method of calculating about 104 number of microorganism/ml with sufficient accuracy actually did not exist.
[0005]For example, since bacteria and impurity are dyed simultaneously, Gram's stain has many oversights of bacteria with few numbers under a microscope. Working efficiency was bad in order that those with two or more and dyeing might take time to a dyeing process (about 15 minutes).
[0006]Although undyed microscopy is quick as a method, when especially micrococcus-like impurity appears, discrimination with a bacillus is impossible.
[0007]Although bacteria detection capacity is higher than the two above-mentioned methods about fluorescent-staining microscopy, when impurity other than bacteria mixes, they are removed effectively and it is not indicated about the method of dyeing bacteria promptly further.
[0008]In the case of the agar-medium method which is a standard method, it requires for measurement of number of microorganism for 16 hours or more, and is hard to say that it is quick.
[0009]Although the method of measuring the urine sample by which fluorescent staining was carried out to U.S. Pat. No. 4,622,298 and JP,9-119926,A with flow cytometer, and detecting bacteria is proposed, neither has measured the sample having contained impurity. Although the method of processing a urine sample in the solution containing a surface-active agent, and

measuring it with flow cytometer as analytical method of the difficult ingredient of discrimination mutually in analysis of the physical component in urine is indicated to JP,9-329596,A, the method of discriminating from bacteria and impurity is not indicated.
[0010]
[Problem(s) to be Solved by the Invention]An object of this invention is to provide the dyeing method which can detect bacteria efficiently promptly without cultivating, and a detecting method, even if impurity exists in a sample.
[0011]
[Means for Solving the Problem]A bacteria dyeing method of this invention consists of making a cationic surface-active agent act, accelerating bacterial coloring matter permeability in a sample containing bacteria, making coloring matter act on it further, and dyeing bacteria it in pH 2.0-4.5.
[0012]
[Embodiment of the Invention]In the above-mentioned pH, this invention persons found out that (1) bacteria are dyed better than neutrality and alkalinity and that un-unique dyeing of (2) mucus thread could be suppressed, and mucus thread could be dissolved to some extent.
[0013]In order to maintain said pH, acid or the buffer of electric dissociation exponent 1-5 can be used. If it is said pH range and a thing which can maintain pH 2.0-3.0 preferably, it will not be limited especially as a buffer, but citrate, an phosphate, phthalate, a glycine, succinic acid, lactic acid, beta-alanine, epsilon-aminocaproic acid, fumaric acid, etc. can be used conveniently. The amount used can be used in the quantity which can maintain said pH range, and can be used in the range of 10 - 500mM.
[0014]Quarternary ammonium salt suitably shown by the following formulas although a cationic surface-active agent in particular is not limited;
[Formula 12]

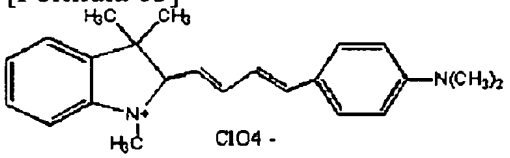


It can use (R_1 is [alkyl group;R_2 of the carbon numbers 8-18, R_3, and R_4] the same or different among a formula, and alkyl group [of the carbon numbers 1-3] or benzyl;Y^- is halogen ion).
[0015]For example, decyl trimethylammonium salt, dodecyl trimethylammonium salt, tetradecyl trimethylammonium salt, hexadecyl trimethylammonium salt, and octadecyl trimethylammonium salt are used suitably. About the amount used, 10-30000mg/l. of 100 - 3000 mg/l is preferably preferred.
[0016]By adding a cationic surface-active agent in the sample containing bacteria, injury of the bacterial cell membrane is carried out, and coloring matter enters easily. As a result, a bacterial intracellular substance and coloring matter join together efficiently, bacteria are often dyed, and it becomes easy to discriminate impurity. On the other hand, mucus thread, red corpuscles, the fragment of a cell, etc. will be dissolved or contracted, and the influence of detection on bacterial will be reduced.
[0017]About coloring matter, especially if bacteria can be dyed in said pH region, it will not be restricted. Although suitable concentration differs for every coloring matter about concentration, it can be used in 0.1-100 ppm (the last concentration), for example. As for coloring matter used from a point of bacterial ability to detect, it is advantageous to use a fluorochrome which combines with one of the ingredients which constitute bacteria at least, and shows a fluorescence. For example, coloring matter of the following (1) - (11) can be

used.

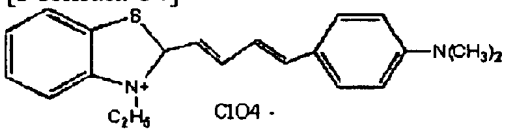
[0018](1) Thiazole orange [0019](2)

[Formula 13]



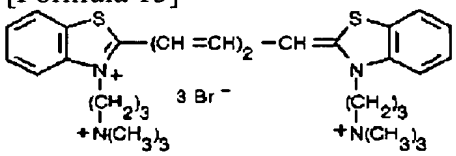
[0020](3)

[Formula 14]



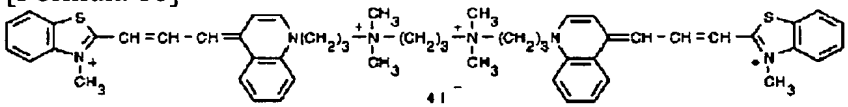
[0021](4)

[Formula 15]



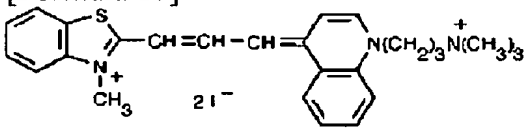
[0022](5)

[Formula 16]



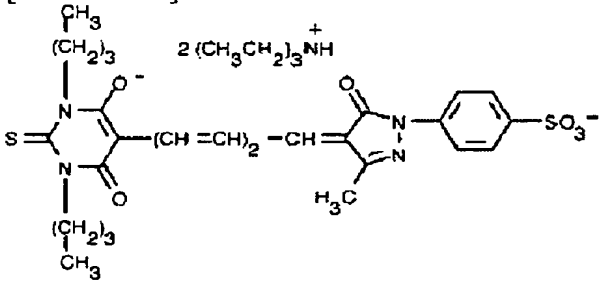
[0023](6)

[Formula 17]



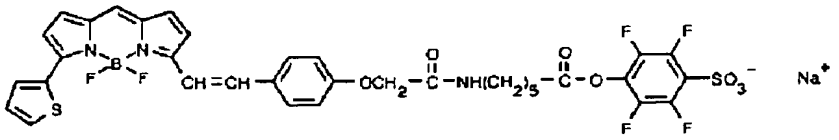
[0024](7)

[Formula 18]

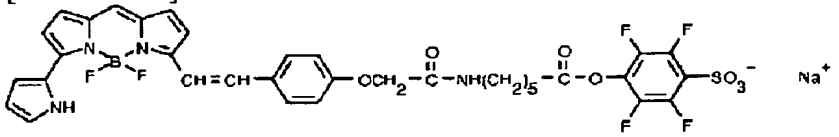


[0025](8)

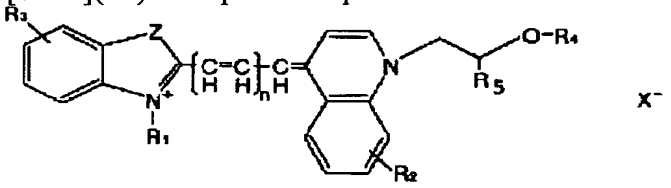
[Formula 19]



[0026](9)
[Formula 20]

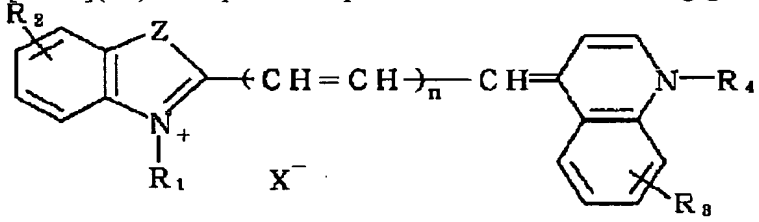


[0027](10) Compound expressed with the following general formulas :[Formula 21]



inside of formula, and R_1 -- alkyl group;R_2 of a hydrogen atom or the carbon numbers 1-3, and R_3 -- a hydrogen atom. The alkyl group of the carbon numbers 1-3, or the alkoxy group of the carbon numbers 1-3; R_4 A hydrogen atom, An acyl group or the alkyl group of the carbon numbers 1-3; 1 or 2;X- of carbon atom;n for which R5 was replaced by the alkyl group of a sulfur atom, an oxygen atom, or the carbon numbers 1-3 as for alkyl group;Z of a hydrogen atom and the carbon numbers 1-3 which may be replaced is an anion.

[0028](11) Compound expressed with the following general formulas : [Formula 22]



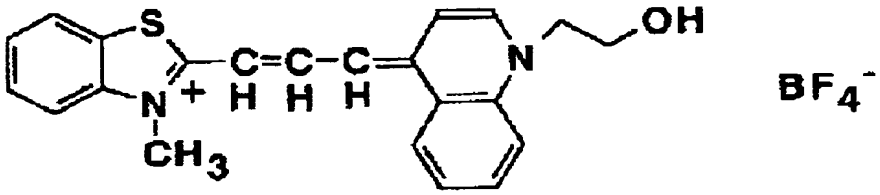
inside of formula, and R_1 -- alkyl group;R_2 of a hydrogen atom or the carbon numbers 1-18, and R_3 -- a hydrogen atom. An alkyl group of the carbon numbers 1-3, or an alkoxy group of the carbon numbers 1-3; R_4 is a hydrogen atom, an acyl group, or carbon in which alkyl group;Z of the carbon numbers 1-18 has sulfur, oxygen, or an alkyl group of the carbon numbers 1-3,;n is 0, 1, or 2, and;X- is an anion.

[0029](1) can obtain a commercial item among these coloring matter. (2) and (3) can be obtained from Japanese Sensitizing dye Research institute. (5) - (9) can be obtained from Molecular Probes and Inc.

[0030]As for (11), a manufacturing method is indicated to JP,10-319010,A (10) at JP,9-104683,A.

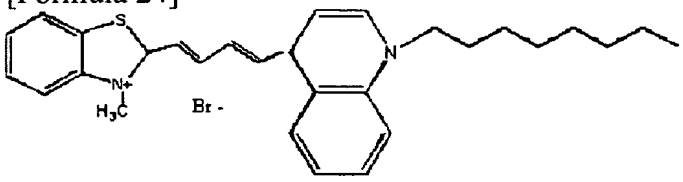
[0031]It is the following coloring matter especially among coloring matter shown by a general formula of (10).;

[Formula 23]



[0032]Coloring matter of especially the next among coloring matter shown by a general formula of (11);

[Formula 24]



** -- it is suitable.

[0033]Since bacterial fluorescent-staining nature is increased and un-unique dyeing of impurity can be controlled by dyeing under coexistence of one of mineral salt among sulfate or a nitrate, it is desirable. As the amount used, it can be used preferably ten to 500 mM in the density range of 50 - 200mM.

[0034]the bacteria checked by a urine sample in the staining technique of this invention -- for example, E.coli, Staphyrococcus sp., Pseudomonas sp., Klebsiella sp., Serratia sp., Enterobacter sp., Enterococcus sp., Streptpococc us sp., Citrobacter sp., etc. are dyed suitably. It is applicable not only to a urine sample but other clinical samples, such as blood and cerebrospinal fluid.

[0035]A staining technique of this invention can be enforced by mixing a sample, solution containing a cationic surface-active agent, and a solution containing coloring matter. Although coloring matter may be made to contain in solution containing a cationic surface-active agent, when coloring matter to be used is unstable in solution, Coloring matter is dissolved into water soluble organic solvents, such as methanol, ethanol, and ethylene glycol, and if it is made to mix with solution which contains a cationic surface-active agent at the time of use, the preservation stability of coloring matter can be raised.

[0036]Although in particular reaction temperature and time are not limited, temperature can be carried out at 15-50 **, and time can be carried out in 15 minutes after immediately after mixing.

[0037]Although a sample dyed by a staining technique of this invention can be observed with a microscope or an image recognition device and can also detect bacteria, it can detect and calculate bacteria with high degree of accuracy by flow cytometry.

[0038]Namely, a detecting method of bacteria of this invention dilutes a sample containing ** bacteria with pH 2.0 to 4.5 solution containing a cationic surface-active agent, Accelerate bacterial coloring matter permeability and the fixed time dyeing reaction of the ** this sample is carried out using a fluorochrome, ** Introduce into a primary detecting element of flow cytometer a sample processed at said process, Cell each of dyed bacteria is irradiated, the scattered light and a fluorescence which are shown from this cell are measured, and a process of separating and calculating bacteria and other ingredients based on pulse width reflecting signal strength of the scattered light of which ** measurement was done, and fluorescence, or the length of particles is included.

[0039]In order to separate and calculate bacteria and other ingredients, it can carry out combining a signal acquired by measurement. Combination of for example, forward scattering light intensity, forward scattering optical pulse width and forward scattering light

intensity, fluorescence intensity, and forward scattering optical pulse width and fluorescence intensity is mentioned as a combination of a signal. A two-dimensional distribution map (scatter diagram) is suitably created first, for example in combination of forward scattering light intensity and forward scattering optical pulse width, Specify a group which contains bacteria on a distribution map, perform gating, mainly separate mucus thread, and further to a group by which gating was carried out in combination of forward scattering light intensity and fluorescence intensity. Furthermore a two-dimensional distribution map is created and bacteria and other ingredients (a crystal, a fragment of a cell, etc.) are separated from a difference in fluorescence intensity. A key map is shown in drawing 7.

[0040]

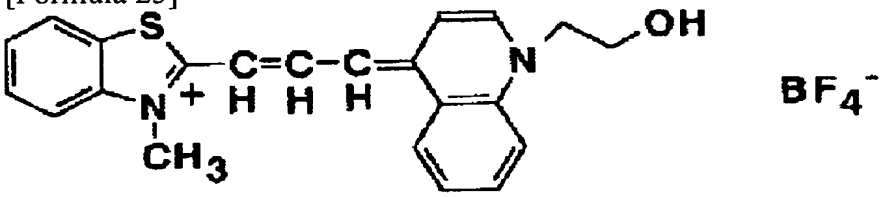
[Example]Although the suitable example for below is shown, this invention is not limited to this.

Example 1 reagent presentation (diluent)

Quantity tetradecyl trimethylammonium star's picture set to citrate 100mMNaOH pH4.1 0.1% (w/v) (stain solution)

Coloring matter A (following structural formulae) 40ppm (ethylene glycol solution)

[Formula 25]



[0041]Diluent 1000mul of the above-mentioned presentation in 100micro of samples l containing culture Escherichia coli and a stain solution were added so that the last concentration of the coloring matter A might be set to 1 ppm, it was made to react for 30 seconds and the flow cytometer which uses a red semiconductor laser as a light source performed 40 ** of measurement of the scattered light and fluorescence (analysis capacity 7.8microl). As contrast, it measured using the reagent which does not contain a tetradecyl trimethylammonium star's picture. A result is shown in drawing 1.

[0042]When the reagent which does not contain a tetradecyl trimethylammonium star's picture was used (left in the figure), fluorescence intensity is 30 or less ch, and most Escherichia coli was not dyed. On the other hand, in the tetradecyl trimethylammonium star's picture, when 0.1% (w/v) was included, the group of (figure Nakamigi) and Escherichia coli was distributed over 50 or more ch with fluorescence intensity, and it was checked that the dye affinity is increasing.

[0043]

example 2 reagent presentation (diluent)

citrate 100mM (pH 2.5) tetradecyl trimethylammonium star's picture 0.1% (w/v) sodium sulfate 90mM (stain solution)

It is the same as Example 1.[0044]The sample containing each culture bacteria (E. coli, S.aureus, Kpneumoniae, C.freundii, E.faecalis) was measured like Example 1 using the reagent of the above-mentioned presentation. A result is shown in drawing 2.

[0045]When each bacteria did not contain a tetradecyl trimethylammonium star's picture, fluorescence intensity was low, and they were hardly dyed, but by adding a tetradecyl trimethylammonium star's picture, fluorescence intensity increased and often being dyed was checked. Compared with the case (this example) where sodium sulfate is added further, and the case (example 1) where sodium sulfate is not included, in this example, fluorescence intensity was increasing more and the effect by addition of sodium sulfate was accepted in Escherichia coli measurement.

[0046]Example 3 dilution linearity Escherichia coli was cultivated, the dilution sample of the dilution factors 1, 10, 100, 1000, 10000, and 100000 was created, and it measured similarly using the same reagent as Example 2. A result is shown in drawing 3. Number of microorganism was searched for by creating a two-dimensional distribution map in the combination of forward scattering light intensity and fluorescence intensity, specifying the group which contains bacteria on a distribution map, and performing gating. As shown in drawing 3, good linearity was acquired in the range of number-of-microorganism abbreviation 10^3 - a 10^7 individual / ml.
[0047]It measured about urine specimen 62 sample using the same reagent as the measurement example 2 of an example 4 urine sample, and correlation with the measurement result in the cultivation by the CLED culture medium considered as contrast was considered.
[0048]Measurement of number of microorganism creates a two-dimensional distribution map first in the combination of forward scattering light intensity and forward scattering optical pulse width, The group which contains bacteria on a distribution map was specified, and gating was performed, and further, about the group by which gating was carried out, it is the combination of forward scattering light intensity and fluorescence intensity, the two-dimensional distribution map was created further, the bacterial field was pinpointed from the difference in fluorescence intensity, and it asked for the number in the pinpointed field. A result is shown in drawing 4.
[0049]The result in the cultivation by a CLED culture medium and good correlation were acquired. In drawing 4, although some points are looked at by the vertical axis, this is considered because the bacillus (bacteriostasis; bacillus which is difficult to grow under the influence of drugs etc.) and killed bacteria which do not grow easily are also detected by a culture medium by this invention to detecting only the useful bacteria at the cultivation by a CLED culture medium.
[0050]The blood sample containing the measurement bacteria of an example 5 blood-culture sample was cultivated using the blood culture bottle, and culture medium was measured. The result of a gram-negative Bacillus (Pseudomonas sp.) is shown in drawing 5, and the result of Gram positive coccus (Staphyrococcussp.) is shown in drawing 6. Number of microorganism was searched for by creating a two-dimensional distribution map in the combination of forward scattering light intensity and fluorescence intensity, specifying the group which contains bacteria on a distribution map, and performing gating. Contrast was visually checked using KOBA 10 grid (HYCOR BIOMEDICAL INC.). In this invention, $2.9x10^5$/ml was received in the viewing method, it received $2.3x10^4$/ml by this invention to $5.2x10^5$/ml, at Gram positive coccus, and the gram-negative Bacillus was $8.8x10^3$/ml in the viewing method.
[0051]
[Effect of the Invention]According to the dyeing method of this invention, since it is dyed by a drainage system, dry immobilization like Gram's stain is not necessarily needed. For this reason, a test sample can be prepared in a short time including a dyeing process, and large shortening of dyeing time is possible.
[0052]Being able to carry out by the easy operation which mixes a sample and a reagent, skill like Gram's stain is not required. Since the dyeing process is easy, the automation from dyeing to measurement (flow cytometry, image analysis, etc.) is easy.
[0053]According to the bacteria detecting method of this invention, it is possible to calculate bacteria with sufficient accuracy, without being influenced by impurity. Specifically, the number of microorganism about a 10^4 individual / ml can be calculated.
[0054]In a culture medium, it can catch certainly also about the bacilli (sample with bacteriostatic action, etc.) which do not grow easily.

[Translation done.]

TECHNICAL FIELD

[Field of the Invention]This invention relates to the dyeing method and detecting method of the bacteria in a clinical sample, and the bacteria which exist in a urine sample suitably especially.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2.**** shows the word which can not be translated.
3.In the drawings, any words are not translated.

PRIOR ART

[Description of the Prior Art]When the bacterial count in urine judges the existence of infection, it is an important parameter on a clinical diagnosis. Generally, the case where 105 or more bacterial counts/ml in urine appear is made into a positivity as a judging standard of urinary tract infection (Urinary Tract Infection). It is considered as negativity noting that it is contamination urine (normal bacterial flora) in 103 or less pieces/ml. About 104 cases/ml are made into re-****** in many cases, although it is a judgment suspension region.

EFFECT OF THE INVENTION

[Effect of the Invention]According to the dyeing method of this invention, since it is dyed by a drainage system, dry immobilization like Gram's stain is not necessarily needed. For this reason, a test sample can be prepared in a short time including a dyeing process, and large shortening of dyeing time is possible.
[0052]Being able to carry out by the easy operation which mixes a sample and a reagent, skill like Gram's stain is not required. Since the dyeing process is easy, the automation from dyeing to measurement (flow cytometry, image analysis, etc.) is easy.
[0053]According to the bacteria detecting method of this invention, it is possible to calculate bacteria with sufficient accuracy, without being influenced by impurity. Specifically, the number of microorganism about a 10^4 individual / ml can be calculated.
[0054]In a culture medium, it can catch certainly also about the bacilli (sample with bacteriostatic action, etc.) which do not grow easily.

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2.**** shows the word which can not be translated.
3.In the drawings, any words are not translated.

TECHNICAL PROBLEM

[Problem(s) to be Solved by the Invention]An object of this invention is to provide the dyeing method which can detect bacteria efficiently promptly without cultivating, and a detecting method, even if impurity exists in a sample.

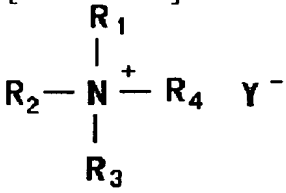
[Translation done.]

* NOTICES *

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2.**** shows the word which can not be translated.
3.In the drawings, any words are not translated.

MEANS

[Means for Solving the Problem]A bacteria dyeing method of this invention consists of making a cationic surface-active agent act, accelerating bacterial coloring matter permeability in a sample containing bacteria, making coloring matter act on it further, and dyeing bacteria it in pH 2.0-4.5.
[0012]
[Embodiment of the Invention]In the above-mentioned pH, this invention persons found out that (1) bacteria are dyed better than neutrality and alkalinity and that un-unique dyeing of (2) mucus thread could be suppressed, and mucus thread could be dissolved to some extent.
[0013]In order to maintain said pH, acid or the buffer of electric dissociation exponent 1-5 can be used. If it is said pH range and a thing which can maintain pH 2.0-3.0 preferably, it will not be limited especially as a buffer, but citrate, an phosphate, phthalate, a glycine, succinic acid, lactic acid, beta-alanine, epsilon-aminocaproic acid, fumaric acid, etc. can be used conveniently. The amount used can be used in the quantity which can maintain said pH range, and can be used in the range of 10 - 500mM.
[0014]Quarternary ammonium salt suitably shown by the following formulas although a cationic surface-active agent in particular is not limited;
[Formula 12]

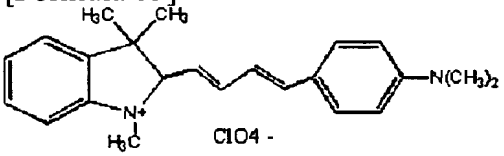


It can use (R_1 is [alkyl group;R_2 of the carbon numbers 8-18, R_3, and R_4] the same or different among a formula, and alkyl group [of the carbon numbers 1-3] or benzyl;Y^- is halogen ion).
[0015]For example, decyl trimethylammonium salt, dodecyl trimethylammonium salt, tetradecyl trimethylammonium salt, hexadecyl trimethylammonium salt, and octadecyl trimethylammonium salt are used suitably. About the amount used, 10-30000mg/l. of 100 - 3000 mg/l is preferably preferred.
[0016]By adding a cationic surface-active agent in a sample containing bacteria, injury of the bacterial cell membrane is carried out, and coloring matter enters easily. As a result, a bacterial intracellular substance and coloring matter join together efficiently, bacteria are often dyed, and it becomes easy to discriminate impurity. On the other hand, mucus thread, red corpuscles, a fragment of a cell, etc. will be dissolved or contracted, and influence of detection on bacterial will be reduced.
[0017]About coloring matter, especially if bacteria can be dyed in said pH region, it will not

be restricted. Although suitable concentration differs for every coloring matter about concentration, it can be used in 0.1-100 ppm (the last concentration), for example. As for coloring matter used from a point of bacterial ability to detect, it is advantageous to use a fluorochrome which combines with one of the ingredients which constitute bacteria at least, and shows a fluorescence. For example, coloring matter of the following (1) - (11) can be used.

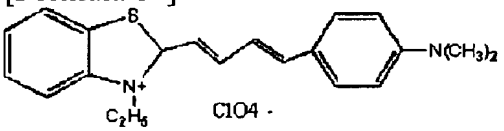
[0018](1) Thiazole orange [0019](2)

[Formula 13]



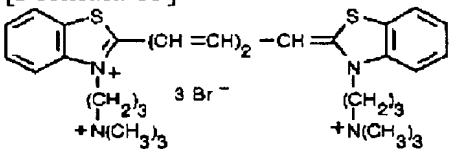
[0020](3)

[Formula 14]



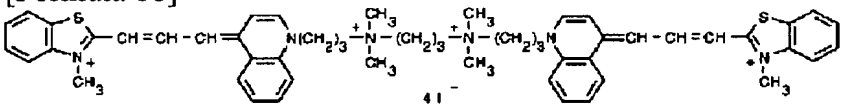
[0021](4)

[Formula 15]



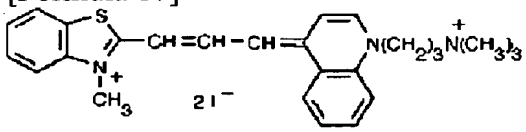
[0022](5)

[Formula 16]



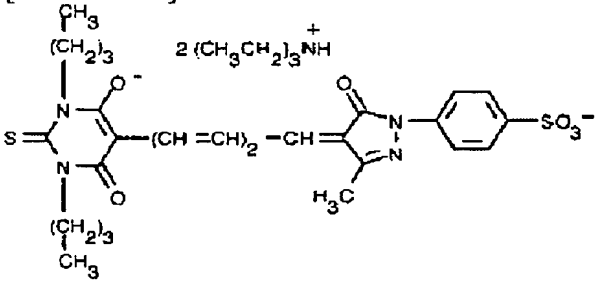
[0023](6)

[Formula 17]

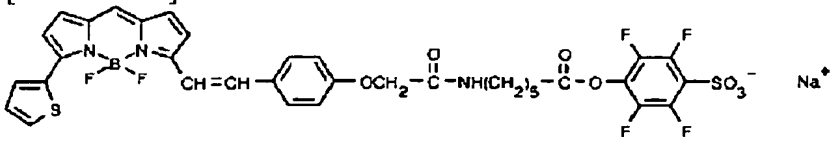


[0024](7)

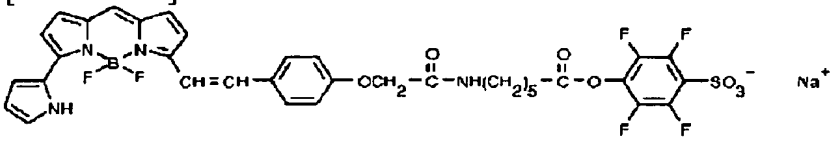
[Formula 18]



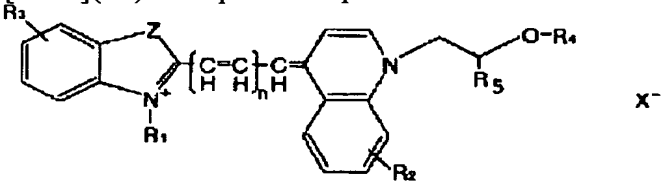
[0025](8)
[Formula 19]



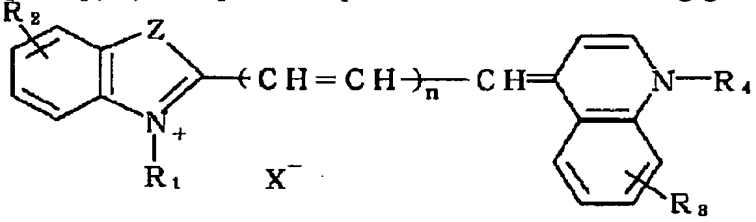
[0026](9)
[Formula 20]



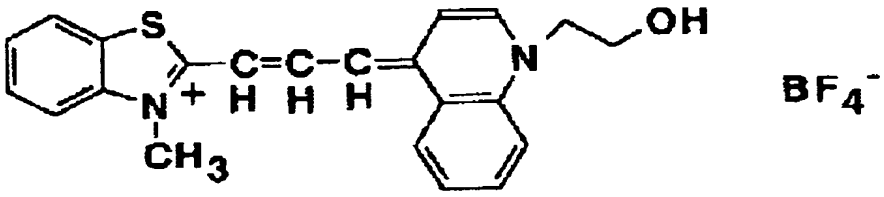
[0027](10) Compound expressed with the following general formulas :[Formula 21]



inside of formula, and R_1 -- alkyl group;R_2 of a hydrogen atom or the carbon numbers 1-3, and R_3 -- a hydrogen atom. An alkyl group of the carbon numbers 1-3, or an alkoxy group of the carbon numbers 1-3; R_4 A hydrogen atom, An acyl group or an alkyl group of the carbon numbers 1-3; 1 or 2;X- of carbon atom;n for which R5 was replaced by an alkyl group of a sulfur atom, an oxygen atom, or the carbon numbers 1-3 as for alkyl group;Z of a hydrogen atom and the carbon numbers 1-3 which may be replaced is an anion.
[0028](11) Compound expressed with the following general formulas : [Formula 22]

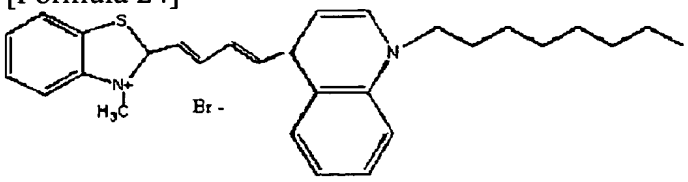


inside of formula, and R_1 -- alkyl group;R_2 of a hydrogen atom or the carbon numbers 1-18, and R_3 -- a hydrogen atom. The alkyl group of the carbon numbers 1-3, or the alkoxy group of the carbon numbers 1-3; R_4 is a hydrogen atom, an acyl group, or carbon in which alkyl group;Z of the carbon numbers 1-18 has sulfur, oxygen, or an alkyl group of the carbon numbers 1-3,;n is 0, 1, or 2, and;X- is an anion.
[0029](1) can obtain a commercial item among these coloring matter. (2) and (3) can be obtained from Japanese Sensitizing dye Research institute. (5) - (9) can be obtained from Molecular Probes and Inc.
[0030]As for (11), a manufacturing method is indicated to JP,10-319010,A (10) at JP,9-104683,A.
[0031]It is the following coloring matter especially among coloring matter shown by a general formula of (10).;
[Formula 23]



[0032]Coloring matter of especially the next among the coloring matter shown by the general formula of (11);

[Formula 24]



** -- it is suitable.

[0033]Since bacterial fluorescent-staining nature is increased and un-unique dyeing of impurity can be controlled by dyeing under coexistence of one of mineral salt among sulfate or a nitrate, it is desirable. As the amount used, it can be used preferably ten to 500 mM in the density range of 50 - 200mM.

[0034]bacteria checked by a urine sample in a staining technique of this invention -- for example, E.coli, Staphyrococcus sp., Pseudomonas sp., Klebsiella sp., Serratia sp., Enterobacter sp., Enterococcus sp., Streptpococc us sp., Citrobacter sp., etc. are dyed suitably. It is applicable not only to a urine sample but other clinical samples, such as blood and cerebrospinal fluid.

[0035]A staining technique of this invention can be enforced by mixing a sample, solution containing a cationic surface-active agent, and a solution containing coloring matter. Although coloring matter may be made to contain in solution containing a cationic surface-active agent, when coloring matter to be used is unstable in solution, Coloring matter is dissolved into water soluble organic solvents, such as methanol, ethanol, and ethylene glycol, and if it is made to mix with solution which contains a cationic surface-active agent at the time of use, the preservation stability of coloring matter can be raised.

[0036]Although in particular reaction temperature and time are not limited, temperature can be carried out at 15-50 **, and time can be carried out in 15 minutes after immediately after mixing.

[0037]Although a sample dyed by a staining technique of this invention can be observed with a microscope or an image recognition device and can also detect bacteria, it can detect and calculate bacteria with high degree of accuracy by flow cytometry.

[0038]Namely, a detecting method of bacteria of this invention dilutes a sample containing ** bacteria with pH 2.0 to 4.5 solution containing a cationic surface-active agent, Accelerate bacterial coloring matter permeability and the fixed time dyeing reaction of the ** this sample is carried out using a fluorochrome, ** Introduce into a primary detecting element of flow cytometer a sample processed at said process, Cell each of dyed bacteria is irradiated, the scattered light and a fluorescence which are shown from this cell are measured, and a process of separating and calculating bacteria and other ingredients based on pulse width reflecting signal strength of the scattered light of which ** measurement was done, and fluorescence, or the length of particles is included.

[0039]In order to separate and calculate bacteria and other ingredients, it can carry out combining a signal acquired by measurement. Combination of for example, forward scattering light intensity, forward scattering optical pulse width and forward scattering light

intensity, fluorescence intensity, and forward scattering optical pulse width and fluorescence intensity is mentioned as a combination of a signal. A two-dimensional distribution map (scatter diagram) is suitably created first, for example in combination of forward scattering light intensity and forward scattering optical pulse width, Specify a group which contains bacteria on a distribution map, perform gating, mainly separate mucus thread, and further to a group by which gating was carried out in combination of forward scattering light intensity and fluorescence intensity. Furthermore a two-dimensional distribution map is created and bacteria and other ingredients (a crystal, a fragment of a cell, etc.) are separated from a difference in fluorescence intensity. A key map is shown in drawing 7.

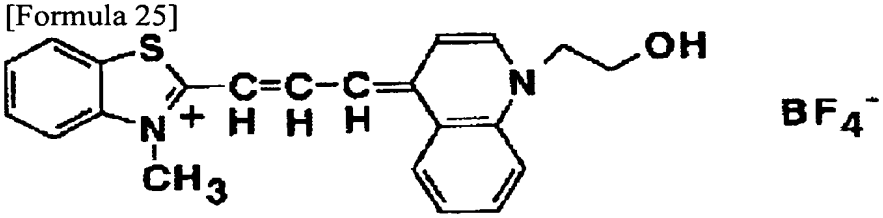
[Translation done.]

* NOTICES *

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2.**** shows the word which can not be translated.
3.In the drawings, any words are not translated.

EXAMPLE

[Example]Although the suitable example for below is shown, this invention is not limited to this.
Example 1 reagent presentation (diluent)
Quantity tetradecyl trimethylammonium star's picture set to citrate 100mMNaOH pH4.1
0.1% (w/v) (stain solution)
Coloring matter A (following structural formulae) 40ppm (ethylene glycol solution)
[Formula 25]



[0041]Diluent 1000mul of the above-mentioned presentation in 100micro of samples l containing culture Escherichia coli and a stain solution were added so that the last concentration of the coloring matter A might be set to 1 ppm, it was made to react for 30 seconds and the flow cytometer which uses a red semiconductor laser as a light source performed 40 ** of measurement of the scattered light and fluorescence (analysis capacity 7.8microl). As contrast, it measured using the reagent which does not contain a tetradecyl trimethylammonium star's picture. A result is shown in drawing 1.
[0042]When the reagent which does not contain a tetradecyl trimethylammonium star's picture was used (left in the figure), fluorescence intensity is 30 or less ch, and most Escherichia coli was not dyed. On the other hand, in the tetradecyl trimethylammonium star's picture, when 0.1% (w/v) was included, the group of (figure Nakamigi) and Escherichia coli

was distributed over 50 or more ch with fluorescence intensity, and it was checked that the dye affinity is increasing.
[0043]
Example 2 reagent presentation (diluent)
Citrate 100mM (pH 2.5) tetradecyl trimethylammonium star's picture 0.1% (w/v) sodium sulfate 90mM (stain solution)
It is the same as Example 1.[0044]The sample containing each culture bacteria (E. coli, S.aureus, Kpneumoniae, C.freundii, E.faecalis) was measured like Example 1 using the reagent of the above-mentioned presentation. A result is shown in drawing 2.
[0045]When each bacteria did not contain a tetradecyl trimethylammonium star's picture, fluorescence intensity was low, and they were hardly dyed, but by adding a tetradecyl trimethylammonium star's picture, fluorescence intensity increased and often being dyed was checked. When sodium sulfate is further added in Escherichia coli measurement

---

[Translation done.]

* NOTICES *

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2.**** shows the word which can not be translated.
3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]
[Drawing 1]In Example 1 of this invention, it is a scatter diagram of fluorescence intensity-forward scattering light intensity when culture Escherichia coli is measured.
[Drawing 2]In Example 2 of this invention, it is a scatter diagram of fluorescence intensity-forward scattering light intensity when the cultivated various bacteria are measured.
[Drawing 3]In Example 3 of this invention, it is the graph which showed the result of the dilution linearity examination.
[Drawing 4]In Example 4 of this invention, it is a correlation diagram of the method of this invention, and the measurement result in a CLED culture medium.
[Drawing 5]In Example 5 of this invention, it is the scatter diagram which showed the measurement result of the gram-negative Bacillus.
[Drawing 6]In Example 6 of this invention, it is the scatter diagram which showed the measurement result of Gram positive coccus.
[Drawing 7]It is a key map of the detecting method of the bacteria in this invention.

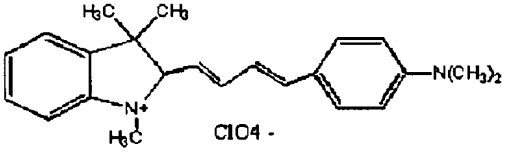
* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

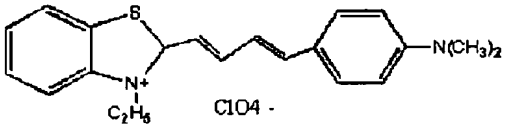
1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2.**** shows the word which can not be translated.
3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

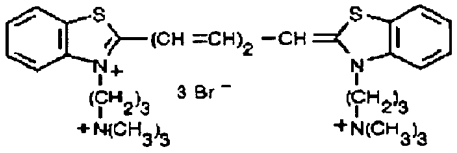
[Claim(s)]
[Claim 1]A bacterial dyeing method which consists of making a cationic surface-active agent act, accelerating bacterial coloring matter permeability in a sample containing bacteria, making coloring matter act on it further, and dyeing bacteria it in pH 2.0-4.5.
[Claim 2]A dyeing method of the bacteria according to claim 1 which are the fluorochromes which said coloring matter combines with one of the ingredients which constitute bacteria at least, and show a fluorescence.
[Claim 3]A dyeing method of the bacteria according to claim 2 in which said fluorochrome is at least one chosen from the following groups. ;
(1) A thiazole orange (2)
[Formula 1]



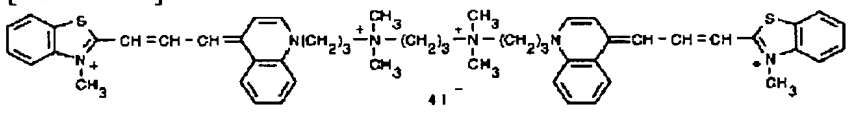
(3)
[Formula 2]



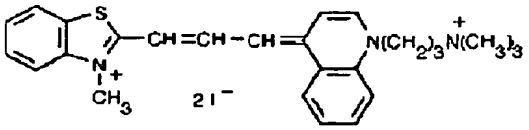
(4)
[Formula 3]



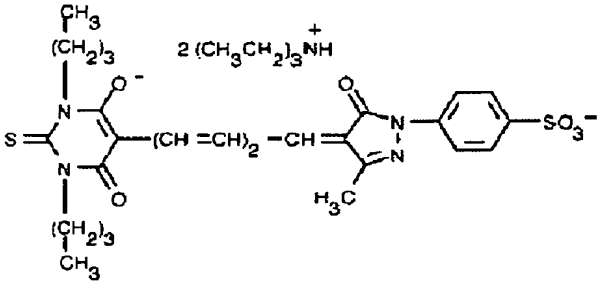
(5)
[Formula 4]



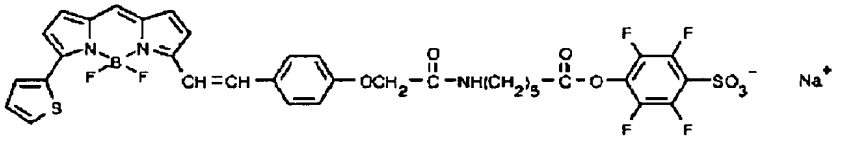
(6)
[Formula 5]



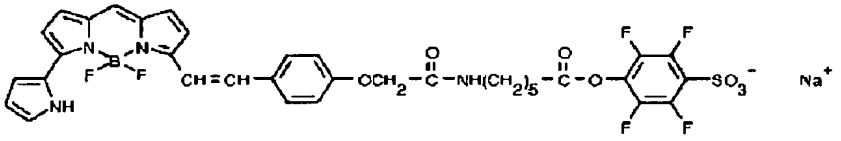
(7)
[Formula 6]



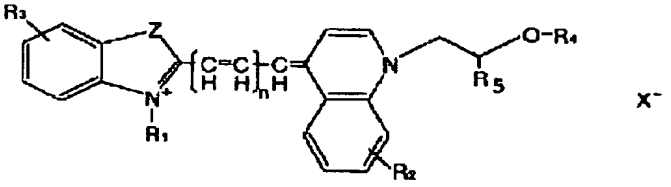
(8)
[Formula 7]



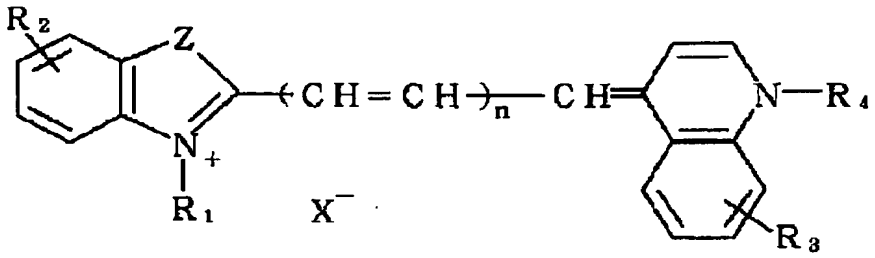
(9)
[Formula 8]



(10) A compound expressed with the following general formulas :[Formula 9]



inside of formula, and R_1 -- alkyl group;R_2 of a hydrogen atom or the carbon numbers 1-3, and R_3 -- a hydrogen atom. The alkyl group of the carbon numbers 1-3, or the alkoxy group of the carbon numbers 1-3; R_4 A hydrogen atom, An acyl group or the alkyl group of the carbon numbers 1-3; 1 or 2;X- of carbon atom;n for which R5 was replaced by the alkyl group of a sulfur atom, an oxygen atom, or the carbon numbers 1-3 as for alkyl group;Z of a hydrogen atom and the carbon numbers 1-3 which may be replaced is an anion.
(11) Compound expressed with the following general formulas : [Formula 10]



inside of formula, and R_1 -- alkyl group;R_2 of a hydrogen atom or the carbon numbers 1-18, and R_3 -- a hydrogen atom. An alkyl group of the carbon numbers 1-3, or an alkoxy group of the carbon numbers 1-3; R_4 is a hydrogen atom, an acyl group, or carbon in which alkyl group;Z of the carbon numbers 1-18 has sulfur, oxygen, or an alkyl group of the carbon numbers 1-3,;n is 0, 1, or 2, and;X- is an anion.

[Claim 4]A dyeing method of the bacteria according to claim 1 which use a buffer of electric dissociation exponent 1-5 in order to maintain said pH.

[Claim 5]A dyeing method of the bacteria according to claim 4 which are at least one chosen from a group which this buffer becomes from citrate, an phosphate, phthalate, a glycine, succinic acid, lactic acid, beta-alanine, epsilon-aminocaproic acid, and fumaric acid.

[Claim 6]Quarternary ammonium salt a cationic surface-active agent is indicated to be by the following formulas;

[Formula 11]